

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Efeito da Administração de Enzimosomas de Superóxido Dismutase na  
Lesão de Reperusão do Fígado. Estudos num Modelo Animal de  
Isquémia/ Reperusão.**

**Filipa Sobreira Pires Salavessa Fontes**

Dissertação

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Especialização em Bioquímica Médica

2012

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**Efeito da Administração de Enzimosomas de Superóxido Dismutase na  
Lesão de Reperfusão do Fígado. Estudos num Modelo Animal de  
Isquémia/ Reperfusão.**

**Filipa Sobreira Pires Salavessa Fontes**

**MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**Especialização em Bioquímica Médica**

**Dissertação orientada pela Doutora Maria Luísa Corvo e pela Prof.  
Doutora Helena Susana Pappámikail da Costa Marinho**

**2012**



# Índice

Agradecimentos .....	vii
Resumo .....	ix
Abstract .....	xi
Índice de Figuras .....	xiii
Índice de Tabelas .....	xvii
Abreviaturas .....	xix
1. Introdução .....	3
1.1. Isquémia/ Reperfusão hepática .....	3
1.1.1. Isquémia .....	3
1.1.1.1. Isquémia a frio .....	5
1.1.1.2. Isquémia a quente .....	5
1.1.2. Reperfusão .....	6
1.1.2.1. Fase inicial .....	7
1.1.2.2. Fase final .....	13
1.1.2.2.1. Mecanismos de ativação dos neutrófilos e a sua acumulação na vasculatura hepática .....	14
1.1.2.2.2. Sinais para extravasão de neutrófilos .....	14
1.1.2.2.3. Stress oxidativo e morte celular induzida por neutrófilo ....	17
1.1.2.2.4. Morte celular induzida por proteases e neutrófilos .....	18
1.2. Regulação da resposta inflamatória hepática .....	19
1.2.1. Mediadores anti-inflamatórios .....	20
1.3. Sistema de defesa antioxidante .....	23
1.3.1. Espécies reativas de oxigénio e I/R .....	23
1.3.2. Óxido nítrico e I/R .....	25
1.3.3. Defesas antioxidantes .....	26
1.3.3.1. Antioxidantes intracelulares .....	27
1.3.3.2. Antioxidantes extracelulares .....	29
1.3.4. Terapia antioxidante .....	31
1.3.4.1. Inibidores da geração de ROS .....	31

# Índice

1.3.4.2.	Antioxidantes membranares e extracelulares .....	32
1.3.4.3.	Antioxidantes intracelulares .....	34
1.3.4.4.	Antioxidantes que modulam o metabolismo do •NO .....	37
1.3.4.5.	Pré-condicionamento isquêmico .....	38
1.3.4.6.	Terapia gênica antioxidante .....	38
1.4.	Biomarcadores hepáticos .....	39
1.4.1.	Aminotransferases .....	40
1.4.1.1.	Alanina aminotransferase .....	40
1.4.1.2.	Aspartato aminotransferase .....	41
1.4.2.	γ-Glutamiltransferase .....	41
1.4.3.	Fosfatase alcalina .....	41
1.5.	Lipossomas .....	43
1.5.1.	Classificação de lipossomas .....	45
1.5.2.	Lipossomas como nanotransportadores de enzimas .....	47
1.5.2.1.	Métodos de preparação de lipossomas para enzimas hidrófilos .....	48
1.5.2.1.1.	Enzimas hidrófilos encapsulados no espaço interno aquoso .....	48
1.5.2.1.2.	Enzimas hidrófilos incorporados na membrana lipídica (Enzimossomas) .....	49
1.5.3.	Aplicação de lipossomas de SOD em patologias de isquemia / reperfusão .....	50
1.5.4.	Aplicações de lipossomas em imagiologia .....	51
2.	Objetivos .....	57
3.	Materiais e Métodos .....	61
3.1.	Materiais .....	61
3.2.	Animais .....	61
3.3.	Preparação das formulações lipossomais .....	62
3.3.1.	Preparação de lipossomas .....	62
3.3.2.	Preparação de enzimossomas .....	63

# Índice

3.3.2.1.Preparação de SOD-ATA.....	63
3.3.2.2.Preparação da formulação lipossomal .....	63
3.3.2.3.Ligação do SOD-AT aos lipossomas.....	64
3.3.2.4.Separação da proteína não ligada da dispersão lipossomal .....	64
3.3.3.Preparação de magnetolipossomas .....	64
3.4.Parâmetros de caracterização das formulações.....	65
3.4.1.Doseamento de lípido .....	65
3.4.2.Doseamento de proteína.....	66
3.4.2.1.Método de Lowry .....	66
3.4.2.2.Método do TCA.....	66
3.4.3.Doseamento de ferro .....	67
3.4.4.Eficácia de encapsulação/conjugação.....	68
3.4.5.Atividade enzimática .....	68
3.4.6.Determinação do diâmetro médio das partículas .....	69
3.4.7.Determinação do potencial zeta .....	69
3.4.8.Purificação com coluna PD10 .....	70
3.5.Técnica de isquemia/reperfusão.....	70
3.6.Recolha de amostras .....	71
3.6.1.Preparação de extratos citosólicos e nucleares .....	71
3.7.Doseamento de biomarcadores de I/R hepática .....	72
3.7.1.Aspartato aminotransferase (AST) .....	72
3.7.2.Alanina aminotransferase (ALT).....	73
3.7.3.Gama glutamiltransferase (GGT) .....	73
3.7.4.Fosfatase alcalina (ALP) .....	74
3.8.Hemograma .....	74
3.9.SDS-PAGE e Western-blot.....	76
3.10.Análise estatística .....	77
4. Resultados e Discussão.....	81

# Índice

4.1.Desenvolvimento e caracterização das formulações.....	81
4.1.1.Lipossomas.....	81
4.1.2.Enzimossomas.....	83
4.1.3.Magnetolipossomas .....	85
4.2.Modelo de isquemia/reperfusão .....	87
4.2.1.Procedimento experimental do modelo de I/R.....	87
4.2.2.Otimização do tempo de I/R induzida para avaliação de parâmetros hepáticos .....	88
4.2.3.Tratamento.....	89
4.3.Efeito das formulações administradas nos parâmetros em análise ....	92
4.3.1.Análises bioquímicas .....	92
4.3.2.Hemograma .....	99
4.3.3.Anatomia patológica.....	101
4.3.4.SDS-PAGE e Western-blot .....	103
5. Conclusões .....	109
6. Perspetiva Futura.....	113
7. Bibliografia .....	117

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não estaria devidamente concluído sem prestar os merecidos agradecimentos às pessoas que o tornaram uma realidade. A todos deixo o meu muito e sincero obrigado.

À Doutora Luísa Corvo agradeço a orientação, formação e os desafios colocados que contribuíram para a minha aprendizagem académica e desenvolvimento pessoal. Um obrigado muito especial.

À Professora Doutora Susana Marinho pela elaboração deste projeto, orientação e revisão da tese.

À Engenheira Bárbara Martins pela sua orientação, ajuda e disponibilidade permanente. Obrigada pelo seu carinho e amizade.

À Professora Doutora Luísa Cyrne por me ter recebido de forma acolhedora no seu laboratório. Um obrigado especial pelo seu próprio ensinamento, orientação, ajuda e constante disponibilidade.

Ao Doutor Paulo Marcelino e ao Doutor Miguel, pelas intervenções cirúrgicas que realizaram.

Ao iMed / Nano&DDS Group / FFUL, por me ter acolhido e por me ter permitido realizar este trabalho.

Ao Instituto Rocha Cabral, pela oferta dos animais.

À Sociedade Portuguesa de Transplantação (SPT) e à Astellas Farma, pelo financiamento do projeto

A todos os amigos da FFUL, pelo apoio constante, simpatia, amizade, acolhimento inigualável, diversão e alegria. Obrigado por todos os momentos juntos que fizeram do laboratório um local especial.

Aos meus amigos da FCTUC, pelos quatro anos que passámos juntos e pelo apoio mesmo que á distância.

Às minhas amigas de Castelo Branco, pela sua amizade ao longo de todos estes anos.



À Mafalda, pela sua grande amizade, carinho e ajuda.

Às minhas avós, Clementina e Ivone, por serem como são. Obrigada por todo o vosso carinho, pela confiança que têm em mim e pelos vossos telefonemas diários.

Ao meu mano Francisco por ser o melhor irmão do mundo. Obrigada por tudo.

Ao meu namorado Nuno, pelo seu amor. Obrigada pela amizade, carinho, ajuda, diversão, apoio, confiança e incentivo que me dás todos os dias.

Aos meus pais, Raul e Rosa, pelo amor, carinho, incentivo, sacrifício e por acreditarem em mim! São o meu exemplo de vida.

## Resumo

A lesão de isquemia/reperfusão do fígado ocorre em inúmeros contextos clínicos, nomeadamente em transplantes, e apresenta taxas significativas de morbilidade e mortalidade. A formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a subsequente reoxigenação do fígado danificam os tecidos e iniciam cascatas celulares que conduzem a uma resposta inflamatória aguda, morte celular e, em última instância, à insuficiência e falha do órgão. Vários investigadores têm desenhado tratamentos com alta potencialidade, baseados na remoção das ROS através da administração de enzimas antioxidantes, tais como o superóxido dismutase (SOD). Este enzima apresenta um perfil farmacocinético pouco favorável, uma vez que ao ser administrado apresenta um curto tempo de vida no plasma (6 a 12 minutos) e uma rápida remoção renal via filtração glomerular. Uma forma de contornar estes problemas é promover a sua associação a um sistema de transporte - os lipossomas - capaz de manter a estrutura e atividade proteica, alterando a sua farmacocinética e entregando-as ao tecido alvo de forma segura, e conseguindo melhorar a eficácia de fármacos proteicos. Nos enzimosomas de SOD utilizados neste trabalho, o enzima terapêutico encontra-se ligado covalentemente à superfície exterior da bicamada do lipossoma, a qual está revestida com PEG. Foi comparada a sua eficácia terapêutica quer com o enzima na forma solúvel quer encapsulado no espaço interno aquoso de lipossomas de longo tempo de circulação (igualmente revestido com PEG).

Neste estudo observou-se que a eficácia de incorporação da proteína na vesícula lipídica varia de lipossomas para enzimosomas, sendo que nesta última formulação o fato de a proteína se encontrar ligada covalentemente à bicamada lipídica, através de um lípido modificado (Maleimida-PEG-PE), aumenta este parâmetro de 9 para 25%. O método de preparação é um fator que condiciona a eficácia de encapsulação/conjugação da proteína à vesícula lipídica. Assim, para os lipossomas recorreu-se ao método de desidratação-rehidratação (DRV) que ajuda a aumentar a eficácia de encapsulação do SOD nos lipossomas. Contudo, o processo de extrusão diminui a eficácia de encapsulação do SOD, uma vez que durante a extrusão os lipossomas rompem e o SOD tem tendência a escapar do espaço interno aquoso para a fase externa. Na preparação de enzimosomas, o método escolhido foi o MLV (suspensão de um filme lipídico numa solução aquosa), obtendo-se vesículas multilamelares. Quanto ao tamanho das vesículas, o seu dimensionamento foi realizado através do processo de extrusão usando filtros de porosidade adequada. No entanto, neste caso este processo não é crítico para a retenção de enzima dado que a associação deste é feita posteriormente. Desta forma, e sabendo que o tamanho é um

fator determinante no sucesso de entrega do fármaco ao seu local alvo, obtiveram-se partículas com diâmetro médio 0,15  $\mu\text{m}$  para ambas as formulações, condição ideal para que atinjam os locais de inflamação originados pela situação de I/R hepática. Foram ainda otimizados vários procedimentos experimentais como a cirurgia de indução da isquemia/reperfusão bem como os tempos de isquemia e posterior recolha de amostras de sangue e de fígado. Assim, optou-se por se realizar os estudos *in vivo* em animais com isquemia induzida durante 30 minutos, e posterior sacrifício para recolha das amostras de sangue e fígado, 24 horas após a cirurgia. A recolha de amostras de sangue permitiu uma análise bioquímica, nomeadamente a atividade de vários enzimas hepáticos (aspartato transaminase, alanina transaminase, fosfatase alcalino e  $\gamma$ -glutamyltransferase) que deveriam apresentar níveis de atividade semelhantes aos animais controlo, após tratamento, ou seja, após administração de SOD. A atividade do aspartato transaminase foi a que mais alterou com a isquemia e com a administração das formulações. Quanto à inversão leucocitária e à análise patológica foram ambas inconclusivas. Os extratos proteicos hepáticos correspondentes quer à fração nuclear, quer à fração citosólica, foram analisados por SDS-PAGE seguido de *western-blot*, de modo a quantificar os níveis de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B $\alpha$ . Este ponto de estudo foi também ele inconclusivo, uma vez que não se observaram diferenças significativas nos níveis de ativação de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B $\alpha$ . Para isso será necessário efectuar no futuro a análise de mais extratos proteicos. Igualmente importante para se ter um melhor retrato do processo de isquémica/reperfusão no fígado e da sua terapêutica será o uso de diferentes tempos de isquemia e de recolha das amostras de fígado.

**Palavras-chave:** isquémica/reperfusão, superóxido dismutase (SOD), enzimas.

## Abstract

Liver ischemia/reperfusion (I/R) injury occurs in several clinical settings, particularly in transplants, and has significant rates of morbidity and mortality. The formation of reactive oxygen species (ROS) and subsequent reoxygenation damages the liver and initiates cellular cascades that lead to an acute inflammatory response, cell death, and ultimately to failure and organ failure. Several researchers have designed treatments with high potential based on the removal of ROS by administration of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD). This enzyme has a very unfavorable pharmacokinetic profile, since it has a short life in plasma (6-12 min) and rapid removal via renal glomerular filtration. One way around these problems is to promote its association with a transport system – liposomes- able to maintain the structure and activity of proteins, altering their pharmacokinetics and delivering them to the target tissue safely, and getting improve the efficiency of protein pharmaceuticals. In the SOD enzymosomes used in this work, the therapeutic enzyme is covalently linked to the outer surface of the liposome bilayer which is coated with PEG. The therapeutic activity of SOD enzymosomes was compared either with free SOD or SOD encapsulated in the inner aqueous space of long circulating liposomes (also coated with PEG)

In this study we observed that the incorporation efficiency of SOD in the lipid vesicle of the liposomes varies for enzymosomes, whereas in the latter formulation the covalently bounding of the protein to the lipid bilayer, *via* a modified lipid (PEG-maleimide- PE), increases this parameter from 9 to 25%. The method of preparation is a factor that affects the entrapment efficiency / conjugation of the protein to lipid vesicle. Thus, in the production of liposomes, the procedure used was dehydration-rehydration (DRV) which helps to increase the encapsulation efficiency of SOD in liposomes. However, the extrusion process decreases the efficiency of encapsulation of SOD since, during extrusion, liposomes rupture and SOD tends to escape from the inner space to the aqueous external phase. The method chosen for the preparation of enzymosomes was the MLV method (suspension of a lipid film in an aqueous solution), whereby multilammellar vesicles were obtained. Regarding the size of the vesicles, their sizing was performed by extrusion using appropriate filters. Knowing that this is a determining factor in the successful delivery of the drug to its target site, we obtained particles with average size of 0.15  $\mu\text{m}$  for both formulations, a size ideal for reaching the sites of inflammation generated by the liver I/R situation. Several experimental procedures such as the surgery for induction of ischemia / reperfusion as well as the time of ischemia and subsequent collection of blood and liver samples were optimized. Thus,

we choose to perform *in vivo* studies in animals with induced ischemia for 30 minutes, and sacrifice them 24 hours after surgery for collection of blood samples and liver. The collection of blood samples allowed a biochemical analysis, including the activities of various liver enzymes (aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase and  $\gamma$ -glutamyltransferase) that should exhibit activity levels similar to control animals after the administration of SOD. Aspartate transaminase activity was the most affected with ischemia and administration of the formulations. As regards to the leukocyte reversal and pathological analysis both were inconclusive. Protein hepatic extracts of the nuclear and cytosolic fraction were analyzed by SDS-PAGE followed by western-blot in order to quantify the levels of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$ . The results were also inconclusive since no significant differences were observed in levels of activated NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  between the animal groups in part due to a high dispersion in the values obtained and the small number samples analyzed. Further studies will be needed in order to increase the number of samples analyzed to reach conclusions. Also, to get a better picture of the liver I/R process and its therapeutics it will be important to test different times of ischemia and of collecting the liver samples.

**Keywords:** ischemia / reperfusion, superoxide dismutase (SOD), enzymosomes.

## Índice de Figuras

**Figura 1-** Apresentação esquemática da fisiopatologia da isquemia/ reperfusão hepática. IL-1 $\beta$ , interleucina 1 $\beta$ ; EC, células endoteliais [Glantzounis *et al.*, 2005].....7

**Figura 2** – Diagrama esquemático da ativação do NF-  $\kappa$ B. A ativação do NF- $\kappa$ B envolve a fosforilação e a subsequente degradação proteolítica da proteína inibitória I $\kappa$ B por específicas I $\kappa$ B cinases. O NF-  $\kappa$ B livre (um heterodímero de p50 e p65) passa para o núcleo, onde se liga a locais  $\kappa$ B em regiões promotoras de genes de proteínas inflamatórias, como citocinas e moléculas de adesão. P significa proteína e mRNA significa RNA mensageiro [Barnes *et al.*, 1997].....9

**Figura 3-** Mecanismos de adesão e transmigração de neutrófilos na microvasculatura hepática. Interações de adesão inicial entre os neutrófilos e o endotélio e subsequente rolamento de neutrófilos, mediado por selectinas. A produção de quimoquinas nas células endoteliais ativa os neutrófilos aderentes e facilita as interações firmes entre integrinas de leucócitos (Mac-1) e moléculas de adesão do endotélio (ICAM-1). Gradientes de quimoquinas no parênquima levam os neutrófilos diretamente para o local da lesão [Lentsch *et al.*, 2000].....12

**Figura 4-** Mecanismos básicos do sistema antioxidante endógeno. XOR e a mitocôndria são as principais fontes intracelulares de produção de ROS. As células de Kupffer e os neutrófilos ativados são as principais fontes de produção extracelular de ROS durante a fase precoce e tardia da reperfusão, respetivamente. As principais enzimas antioxidantes intracelulares são a SOD, catalase e GSH peroxidase. O  $\alpha$ -tocoferol e a coenzima Q são os principais antioxidantes presentes na membrana celular. PMN- célula polimorfonuclear; NADPH- fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina; GSH e GSSG- glutationo reduzido e oxidado, respetivamente [Glantzounis *et al.*, 2005].....29

**Figura 5-** Ilustração da ligação do SOD modificado (Cu, Zn-SOD-SH) ao DSPE-PEG (2000) Maleimido, presente na superfície do lipossoma. Adaptado de Vale *et al.*, 2006.....84

**Figura 6-** Perfil tipo de eluição obtido para a separação de SOD-ATA do SATA por cromatografia de exclusão molecular (coluna PD10) usando como eluente tampão de citratos a 10 mM com NaCl a 140 mM e EDTA a 1 mM, a pH 6. Absorvência medida a 238 e 280 nm. ....84

**Figura 7-** Fotografias referentes aos vários momentos cirúrgicos de isquemia/reperfusão induzida. ....88

**Figura 8** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de AST no sangue de rato. Os animais sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.....93

**Figura 9** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de ALT do sangue de rato. Os animais sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.....95

**Figura 10** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de ALP do sangue de rato. Os animais sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.....97

**Figura 11** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de GGT do sangue de rato. Os animais sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.....98

**Figura 12** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de p65 no fígado de rato, determinados por Western blot. Níveis do p65 no citosol (a) e no núcleo (b) e quantificação dos níveis de p65 no citosol e núcleo (c) a partir de nove amostras de extratos proteicos de homogenatos hepáticos. 1- Controlo; 2-SHAM; 3- Operado; 4 e 5- SOD; 6 e 7- SODLip; 8 e 9- SOD-Enzimo. p65 no citosol (cor vermelha) e no núcleo (cor azul) (c). A quantificação foi feita através do *software ImageJ* e estão indicados a média  $\pm$  SD.....104

**Figura 13-** Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de I $\kappa$ B no fígado de rato, determinados por Western blot. Níveis I $\kappa$ B $\alpha$  no citosol (a) e no núcleo (b) e quantificação dos níveis de I $\kappa$ B citosólicos (c) a partir de nove amostras de extratos proteicos de homogenatos hepáticos. 1- Controlo; 2-SHAM; 3- Operado; 4 e 5- SOD; 6 e 7- SODLip; 8 e 9- SOD-Enzimo. A quantificação foi feita através do *software ImageJ* e estão indicados a média  $\pm$  SD.....105





## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Parâmetros de caracterização da formulação de lipossomas com SOD (SOD-Lip). Os resultados são a média $\pm$ desvio padrão de n=3 experiências independentes. ....	82
<b>Tabela 2-</b> Parâmetros de caracterização, da formulação de enzimosomas com SOD (SOD-Enzimo). Os valores indicados correspondem a cinco experiências independentes (n=5). ....	85
<b>Tabela 3-</b> Parâmetros de caracterização da formulação de magnetolipossomas com óxido de ferro (IO). Os resultados apresentados são a média $\pm$ desvio padrão de 3 experiências independentes.....	86
<b>Tabela 4-</b> Parâmetros de caracterização das formulações de lipossomas com SOD (SOD-Lip) e enzimosomas de SOD (SOD-Enzimo) administradas.....	89
<b>Tabela 5-</b> Doses, e atividade enzimática correspondente de SOD, na forma “livre” (SOD “livre”), lipossomal (SOD-Lip), e em enzimosomas (SOD-Enzimo), administradas por animal.....	90
<b>Tabela 6-</b> Dados obtidos pelo teste <i>ANOVA fator único</i> : existência de diferença ( $\neq$ ) ou igualdade (=) entre os níveis de AST nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo). ....	94
<b>Tabela 7-</b> Dados obtidos pelo teste <i>ANOVA fator único</i> : existência de diferença ( $\neq$ ) ou igualdade (=) entre os níveis de ALT nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo).....	95
<b>Tabela 8-</b> Dados obtidos pelo teste <i>ANOVA fator único</i> : existência de diferença ( $\neq$ ) ou igualdade (=) entre os níveis de ALP nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo).....	97
<b>Tabela 9-</b> Dados obtidos pelo teste <i>ANOVA fator único</i> : existência de diferença ( $\neq$ ) ou igualdade (=) entre os níveis de GGT nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo). ....	99

**Tabela 10-** Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD na inversão leucocitária (I.L.) no sangue de rato. Os ratos sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h estando indicado para os diferentes grupos o número de animais que apresentaram inversão leucocitária (I.L.) e sem inversão leucocitária. Controlo (n=2), SHAM (n=2), Operados (n=9), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=3). .....100

**Tabela 11-** Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD em diversos parâmetros da anatomia patológica hepática. Foi feita a análise de 1 animal do grupo *Controlo*, 3 animais do grupo *Op* (Operados), 3 animais a que se administrou com *SOD* (SOD livre), 3 animais a que se administrou *SOD-Lip* (SOD lipossomal) e 3 animais a que se administrou *SOD-Enzimo* (enzimosomas com SOD). Situação normal (-), alterações mais ligeiras (+), alterações marcadas (++), alterações mais marcadas (+++). .....102

## Abreviaturas

ALP- Fosfatase alcalina

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

CAMs- Moléculas de adesão celular

CAT- Catalase

Chol- Colesterol

COX- Ciclooxygenase

DNA- ácido desoxirribonucleico

DRV- Desidratação-rehidratação

DSPE- distearoilfosfatidiletilenoamina

E.C.- Eficácia de conjugação

E.E.- Eficácia de encapsulação

Egg-PG- fosfatidilcolina de ovo

GGT- Gama glutamiltransferase

GPXs- Glutathione peroxidase

GSH- Glutathione reduzido

GSSH- Glutathione oxidado

HO- Heme oxygenase

HO<sup>•</sup>- Radical hidroxilo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de hidrogénio

ICAMs- Moléculas de adesão intracelular

IκBα- Inibidor do fator de transcrição nuclear κB

IL- Interleucina

iNOS- óxido nítrico sintase induzível

IPC- Pré-condicionamento isquêmico

I/R- Isquemia/Reperusão

i.m.- Intramuscular

i.v.- Intravenoso

KC- Células de Kupffer

LDH- Lactato desidrogenase

LPO- Peroxidação lipídica

LUV- Grandes vesículas unilamelares

MHC- Complexo maior de histocompatibilidade

MLs- Magnetolipossomas

MLV- Vesículas multilamelares

MPO- Mieloperoxidase

MPS- Sistema fagocitário mononuclear

MRI- Ressonância magnética por imagem

NADPH- Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reduzido

NF- $\kappa$ B- Fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B

NOS- óxido nítrico sintase

NPC- Células não parenquimatosas

$\bullet$ NO – óxido nítrico

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito

O<sub>2</sub>- Dioxigênio

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical superóxido

PC- Fosfatidilcolina

PE- Fosfatidiletanolamina

PEG- Polietilenoglicol

PEG-PE- fosfatidiletanolamina peguilada

PMN- Células polimorfonucleares

RNS- Espécies reativas de azoto

ROS- Espécies reativas de oxigénio

SATA- N-succinimidil-S-acetil-tioacetato

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio

SEC- Células do endotélio sinusoidal

SLPI- Inibidor de protease de leucócito secretor

SOD- Superóxido dismutase

SPIOs- Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas

SUV- Pequenas vesículas unilamelares

Tc- Temperatura de transição de fase

TCA- Ácido tricloroacético

TNF  $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa

VCAMs- Moléculas de adesão de células vasculares

XO- Xantina oxidase



# 1. Introdução

---





### 1.1 Isquémia/Reperusão hepática

A falta no fornecimento de sangue a um órgão ou tecido e a consequente privação de oxigénio, é definida como isquémia, sendo que sem o restabelecimento de sangue oxigenado os tecidos isquémicos morrem por necrose. A reperusão, ou seja, o restabelecimento do fluxo sanguíneo, é o tratamento definitivo para a isquémia [Laubach *et al.*, 2011]. Considera-se que a lesão de isquémia/reperusão (I/R) hepática é um processo multifatorial que altera o funcionamento do fígado após um transplante, de forma que é necessário compreender os eventos bioquímicos por detrás desta situação para que se possam desenvolver estratégias terapêuticas que aumentem o sucesso na área do transplante hepático. A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a subsequente reoxigenação, danificam os tecidos e iniciam cascatas celular que conduzem a uma resposta inflamatória aguda, morte celular e, em última instância, à insuficiência e falha do órgão. [Kupiec-Weglinski & Busuttil, 2005]. Sabe-se que a lesão de I/R é independente de antígenos e inclui a ativação de células de Kupffer (KC), a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), a infiltração de neutrófilos, o aumento da expressão de moléculas de adesão, a libertação de citocinas, o desprendimento de células do endotélio sinusoidal bem como o dano de hepatócitos. Contudo, apesar de estar pouco claro o mecanismo exato por detrás destas alterações, inúmeras evidências atribuem um papel chave às espécies reativas de oxigénio [Zhang *et al.*, 2007]. A lesão de isquémia quente/ reperusão do fígado ocorre em inúmeros contextos clínicos, tais como em cirurgias de ressecção hepática, transplantes de fígado, e choque hemorrágico com fluidoterapia, que apresentam taxas significativas de morbilidade e mortalidade. [Lentsch *et al.*, 2000]. Atualmente não existe nenhum tratamento para a I/R, sendo que têm sido aplicadas várias abordagens de forma a atenuar esta lesão hepática, a nível laboratorial, tais como o uso de anticorpos para leucócitos e moléculas de adesão de células endoteliais, a inibição das células de Kupffer e o uso de vários agentes antioxidantes [Zhang *et al.*, 2007].

#### 1.1.1 Isquémia

Quando o oxigénio fornecido às células se torna insuficiente, devido à diminuição do fluxo sanguíneo, ocorrem alterações no estado de oxidação-redução dos enzimas, o qual se torna reduzido, bem como na cadeia respiratória mitocondrial, a qual fica inibida resultando na redução da síntese de adenosina trifosfato (ATP). [Gonzalez-Flecha *et al.*, 1993]. Esta diminuição celular de ATP altera a translocação de iões pela

membrana através da inibição da ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , a qual é dependente de ATP, resultando num influxo de sódio e na sua acumulação intracelular que conduz à turgescência e morte da célula [Glantzounis *et al.*, 2005]. A acumulação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  está também envolvida no desenvolvimento da lesão de I/R hepática, e parece fundamental na transição para danos irreversíveis [Dhar *et al.*, 1996]. O aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico conduz à ativação de fosfolipases da membrana celular que levam à degradação de fosfolípidos e à disrupção da membrana celular. Antes da morte celular, os hepatócitos e outras células desenvolvem um estado caracterizado pela abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial, disrupção lisossomal, formação e crescimento de “blebs”, turgescência celular e perda de solutos de baixa massa molecular. O cálcio ativa ainda a xantina oxidoredutase (XOR) que apresenta um papel na produção de ROS após a reperfusão [Glantzounis *et al.*, 2005].

O fígado é constituído por células parenquimatosas (PC), os hepatócitos, e não parenquimatosas (NPC), que incluem as células de Kupffer (KC), células do endotélio sinusoidal (EC), células estreladas hepáticas (também conhecidas como células perisinusoidal ou células Ito) e células dendríticas hepáticas [Tsung *et al.*, 2005]. Amplas evidências sugerem que a ativação das células de Kupffer, PMN (neutrófilos polimorfonucleares) e células endoteliais conduzem à formação de ROS, espécies críticas na patogénese da lesão de I/R hepática [Kupiec-Weglinski & Busuttil, 2005]. As células endoteliais são ativadas durante a I/R para expressarem uma série de moléculas de adesão de superfície e antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), para interações adicionais do endotélio com neutrófilos polimorfonucleares. Assim, a acumulação e ativação dos neutrófilos agrava a microcirculação no tecido lesado e conduz à adesão entre duas células, provavelmente mediada por integrinas e moléculas de adesão intracelular (ICAMS) [Nagendra *et al.*, 1997]. As células de Kupffer, os macrófagos residentes do fígado que se encontram no espaço sinusoidal, parecem ser resistentes à isquémia e tornam-se ativas durante a reperfusão. Assim, quando ativadas as células de Kupffer produzem citocinas pró-inflamatórias (PGs, PAF, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e ROS que atuam como citotoxinas para as células endoteliais e hepatócitos; induzem alterações nos recetores da membrana celular dos hepatócitos, EC e PMN; ativam neutrófilos e outras KC; e podem induzir gradientes quimiotáticos para os neutrófilos [Kupiec-Weglinski & Busuttil, 2005].

Existem algumas diferenças nos mecanismos que provocam lesão após isquémia a frio ou a quente. Nos transplantes hepáticos, o fígado isquémico sofre armazenamento a frio, seguido por reaquecimento por isquémia e reperfusão. A isquémia a frio está associada a uma diminuição na fosforilação oxidativa, baixos níveis de ATP celular e

aumento da glicólise [Churchill *et al.*, 1997], enquanto que a isquémia a quente conduz a um maior *stress* oxidativo e disfunção mitocondrial [Mochida *et al.*, 1994]. Na isquémia a frio, as células não parenquimatosas (células de Kupffer, células do endotélio sinusoidal, células Ito e epitélio biliar) são as mais lesadas enquanto que na isquémia a quente são os hepatócitos [Glantzounis *et al.*, 2005].

### 1.1.1.1 Isquémia a frio

Como referido acima, quando comparadas com os hepatócitos, as células não parenquimatosas são mais susceptíveis à lesão provocada pela isquémia a frio/reperfusão, sendo que após um transplante hepático em que o fígado é armazenado a frio, ocorre apoptose das células do endotélio sinusoidal [Kupiec-Weglinski & Busuttil, 2005]. A separação das células sinusoidais da sua matriz é um componente crítico que determina a viabilidade do órgão, e parece ser mediada por algumas proteases, como a aspartato protease e metaloproteínas da matriz, em particular as gelatinases. Foi sugerido recentemente que os mediadores angiogénicos induzem a libertação de proteases no fígado hipotérmico, sendo que o mediador específico não está ainda identificado. Curiosamente, o lactobionato, uma substância chave na solução da Universidade de Wisconsin (UW), tem um poderoso efeito inibitório das gelatinases, muito provavelmente devido à quelatação do cálcio e do zinco. Estas observações explicam a preferência no uso da solução UW em relação a outras soluções, na preservação do endotélio sinusoidal do fígado. Assume-se portanto, que a lesão das células do endotélio sinusoidal inicia-se com processos proteolíticos e que inibidores específicos de metaloproteínases ou de compostos angiogénicos apresentam um potencial terapêutico na preservação deste endotélio. Contudo, e apesar dos efeitos prejudiciais da isquémia na integridade do endotélio sinusoidal, sabe-se que as SEC permanecem viáveis até à reperfusão, mas podem morrer rapidamente após este evento [Bilzer & Gerbes, 2000].

### 1.1.1.2 Isquémia a quente

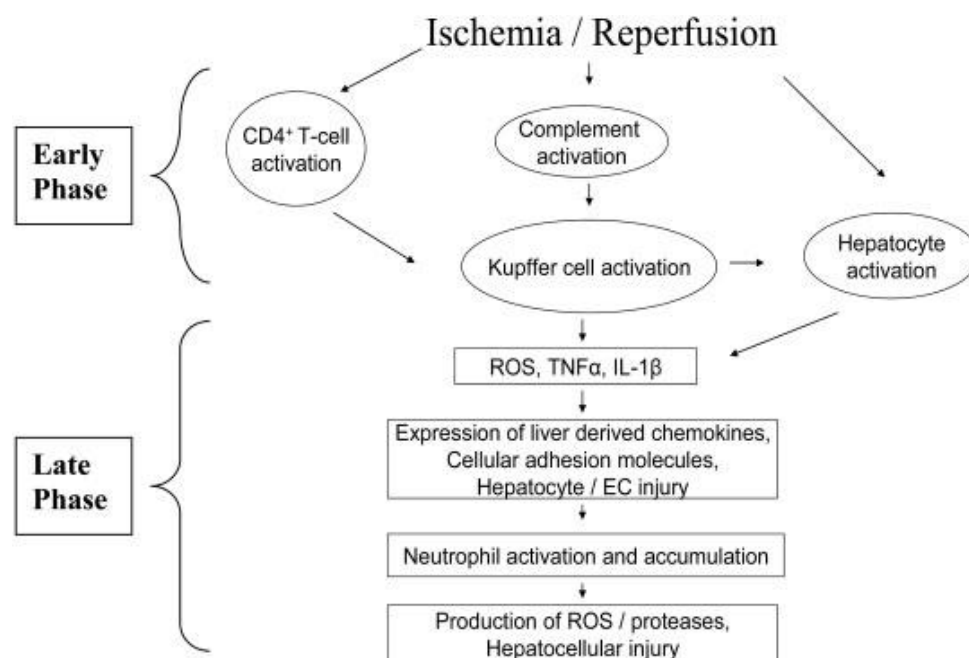
Durante a isquémia a quente, os hepatócitos são as células mais vulneráveis, sendo que a causa pode estar no aumento da atividade das proteases não-lisossomais, preferencialmente em hepatócitos anóxicos [Noack *et al.*, 1993]. A morte destes hepatócitos desprovidos de oxigénio pode ser prevenida pela inibição da proteólise não lisossomal através de acidose ou recorrendo ao uso de glicina [Nichols *et al.*, 1994]. Sabendo que a citoproteção da glicina está associada com a inibição dos

proteases de cisteína dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (calpaínas) [Nichols et al., 1994], estas proteínas têm a capacidade de degradar proteínas do citoesqueleto como a espectrina, mecanismo proposto para explicar a instabilidade membranar que pode levar à necrose celular [Saïdo et al., 1994]. Danos adicionais podem ainda resultar em processos de transdução de sinal através da clivagem da proteína cinase C (PKC) [Bilzer & Gerbes, 2000]. Contudo, alguns estudos [Kohli et al., 1997] e [Kohli et al., 1999] demonstram que os calpaínas medeiam as lesões provocadas quer pela isquemia a frio, quer pela isquemia a quente em fígados de rato. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ativam os calpaínas em diferentes populações de células em fígado isquémico [Gasbarrini et al., 1992] e [Arnauld et al., 1992]. Desta forma, os calpaínas parecem ser modulados por hormonas como o péptido natriurético atrial, o qual atenua o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  em hepatócitos em situação de hipoxia. Estudos do final do século passado, em modelos animais de isquemia a quente e a frio, demonstraram a clara proteção do pré-tratamento com inibidores de calpaínas [Kohli et al., 1997] e [Kohli et al., 1999] ou glicina [Schemmer et al., 1999] contra a lesão de I/R. A relevância clínica destas descobertas é suportada por estudos em humanos que indicam uma forte correlação entre a ativação de calpaínas ou a proteólise extracelular e a lesões provocadas por transplantes [Bilzer & Gerbes, 2000].

### **1.1.2 Reperfusão**

A lesão nas células e tecidos provocada pela reperfusão é bem mais severa e grave que a causada pela isquemia, sendo que evidências experimentais demonstram a existência de duas fases distintas na lesão de reperfusão do fígado [Glantzounis et al., 2005]. A fase inicial, que cobre as duas primeiras horas após a reperfusão, tem como principal evento a ativação das células de Kupffer (Figura 1), que ocorre como consequência da ativação do complemento, recrutamento e ativação dos linfócitos T  $\text{CD4}^+$ . A ativação das células de Kupffer conduz a alterações estruturais, à formação vascular de ROS e à produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 (IL-1). Estas ROS e citocinas têm um efeito citotóxico nas células endoteliais e induzem alterações nos recetores membranares dos hepatócitos que levam à libertação de mais citocinas [Glantzounis *et al.*, 2005]. Quanto ao TNF- $\alpha$ , mediador central na resposta hepática à reperfusão, induz a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais vasculares e estimula a produção e libertação de quimiocinas atrativas de neutrófilos. São estes neutrófilos recrutados que vão libertar ROS e proteases, responsáveis por induzir *stress oxidativo* na fase final da reperfusão, a qual é bem mais grave quando comparada com a fase inicial [Glantzounis *et al.*,

2005]. Mais ainda, o aumento da adesão de neutrófilos na microvasculatura hepática pode levar à conexão sinusoidal e à redução da perfusão [Husted & Lentsch, 2006]. Quanto á resposta inflamatória caraterística da lesão de reperfusão, esta é iniciada com a ativação transcricional de fatores pró-inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão endotelial e ROS) que facilitam o recrutamento de leucócitos para o tecido ou órgão pós isquêmico [Husted & Lentsch, 2006].



**Figura 1-** Apresentação esquemática da fisiopatologia da isquemia/ reperfusão hepática. IL-1 $\beta$ , interleucina 1 $\beta$ ; EC, células endoteliais [Glantzounis *et al.*, 2005].

### 1.1.2.1 Fase inicial

#### IL-12

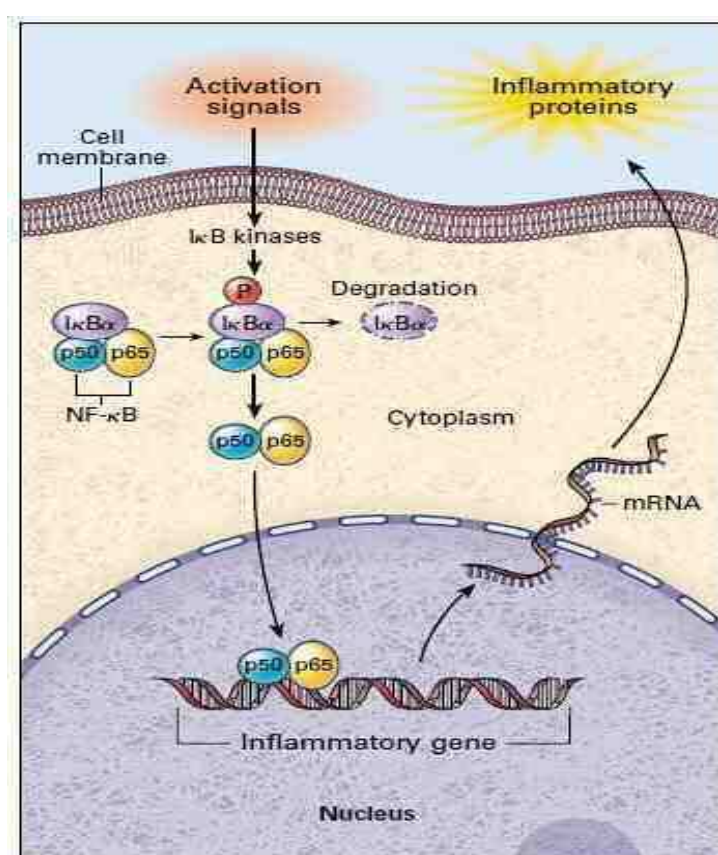
A interleucina-12 (IL-12) foi inicialmente descoberta como uma citocina produzida por fagócitos com efeitos pleiotrópicos em linfócitos [Kobayashi *et al.*, 1989]. Alguns anos mais tarde, demonstrou-se que apresenta um papel importante no desenvolvimento de células Th1 após infecção [Hsieh *et al.*, 1993] e [Manetti *et al.*, 1993]. A IL-12 é produzida como um heterodímero de 35 kDa, correspondente à cadeia leve (p35), e de 40 kDa, correspondente à cadeia pesada (p40). Enquanto que a p35 é expressa constitutivamente, a cadeia pesada p40 é produzida em resposta a alguns estímulos Trinchieri, 2003]. A IL-12 provoca efeitos nas suas células alvo *via* recetores

específicos compostos por duas cadeias (IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2) [Husted & Lentsch, 2006]. Os efeitos da IL-12 na fisiologia do fígado foram primeiramente documentados por Myers *et al.* [Myers et al., 1998]. Nestes estudos, após administração de IL-12 em ratinhos, houve um aumento na ativação das células de Kupffer e na expressão de moléculas de adesão celular vascular, o que sugere que a IL-12 pode preparar o fígado para situações de inflamação. Consequentemente, demonstrou-se num modelo murino de I/R hepática, que a deleção genética ou a neutralização da IL-12 tinha um efeito altamente protetor contra a inflamação no fígado [Lentsch et al., 1999]. Este estudo, demonstra também que a expressão da IL-12 ocorre ainda durante o período de isquemia, o que é necessário para a total indução da citocina pro-inflamatória mais importante: o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). A neutralização da IL-12 leva ainda à redução de neutrófilos acumulados no fígado, os quais medeiam a lesão pós-isquêmica [Husted & Lentsch, 2006]. Sabe-se que o mecanismo pelo qual a IL-12 induz inflamação no fígado envolve o fator de transcrição NF- $\kappa$ B que fica ativo em vários tipos de células [Husted & Lentsch, 2006].

### NF- $\kappa$ B

O fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B é um regulador fundamental da transcrição de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, como o TNF- $\alpha$  e IL-1, quimiocinas, como a IL-8, e moléculas de adesão a células vasculares. O NF- $\kappa$ B é composto por um número de combinações diméricas de proteínas da família Rel, as quais possuem propriedades de ativação transcricional [Ghosh et al., 1998]. A forma primária do NF- $\kappa$ B é um heterodímero composto pela proteína p50 (NF- $\kappa$ B1) e p65 (RelA). Este complexo tem a capacidade de se ligar a sequências promotoras de DNA e de iniciar a transcrição de vários genes pró-inflamatórios, tal como esquematizado na figura 2. Contudo, outras combinações de membros da família Rel têm sido identificadas (ex.: p65/p52), as quais podem apresentar preferências para diferentes sequências promotoras [Perkins et al., 1992]. Em células não estimuladas, o NF- $\kappa$ B está retido no citoplasma através de interações com proteínas inibitórias da família I $\kappa$ B. Todas as proteínas da família I $\kappa$ B, contêm domínios de repetição de ankaryn, cuja função é facilitar as interações proteína-proteína. No caso das interações I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, os domínios de repetição de ankaryn das proteínas I $\kappa$ B, impedem a translocação celular do NF- $\kappa$ B mascarando as sequências de localização nuclear dos heterodímeros de NF- $\kappa$ B. Em resposta a uma ampla variedade de estímulos celulares, as proteínas I $\kappa$ B dissociam-se do complexo com o NF- $\kappa$ B, e são degradadas proteoliticamente pelo proteossoma 26S. Este processo de degradação varia entre as diferentes proteínas

I $\kappa$ B. Contudo todos eles envolvem a fosforilação da I $\kappa$ B por membros da família I $\kappa$ B cinase (IKK) [DiDonato et al., 1997]. A degradação do I $\kappa$ B expõe as sequências de localização nuclear do NF- $\kappa$ B, e o dímero NF- $\kappa$ B pode então translocar-se para o núcleo e aí iniciar a transcrição de genes alvo [Husted & Lentsch, 2006]. A ativação do NF- $\kappa$ B na fase pró-inflamatória da lesão de isquemia/reperfusão do fígado está bem estabelecida. Assim, cada mediador pró-inflamatório a jusante da IL-12, é controlado pelo NF- $\kappa$ B, o que sugere que este fator de transcrição pode ser um potencial alvo terapêutico [Husted & Lentsch, 2006].



**Figura 2** – Diagrama esquemático da ativação do NF- $\kappa$ B. A ativação do NF- $\kappa$ B envolve a fosforilação e a subsequente degradação proteolítica da proteína inibitória I $\kappa$ B por específicas I $\kappa$ B cinases. O NF- $\kappa$ B livre (um heterodímero de p50 e p65) passa para o núcleo, onde se liga a locais  $\kappa$ B em regiões promotoras de genes de proteínas inflamatórias, como citocinas e moléculas de adesão. P significa proteína e mRNA significa RNA mensageiro [Barnes *et al.*, 1997].

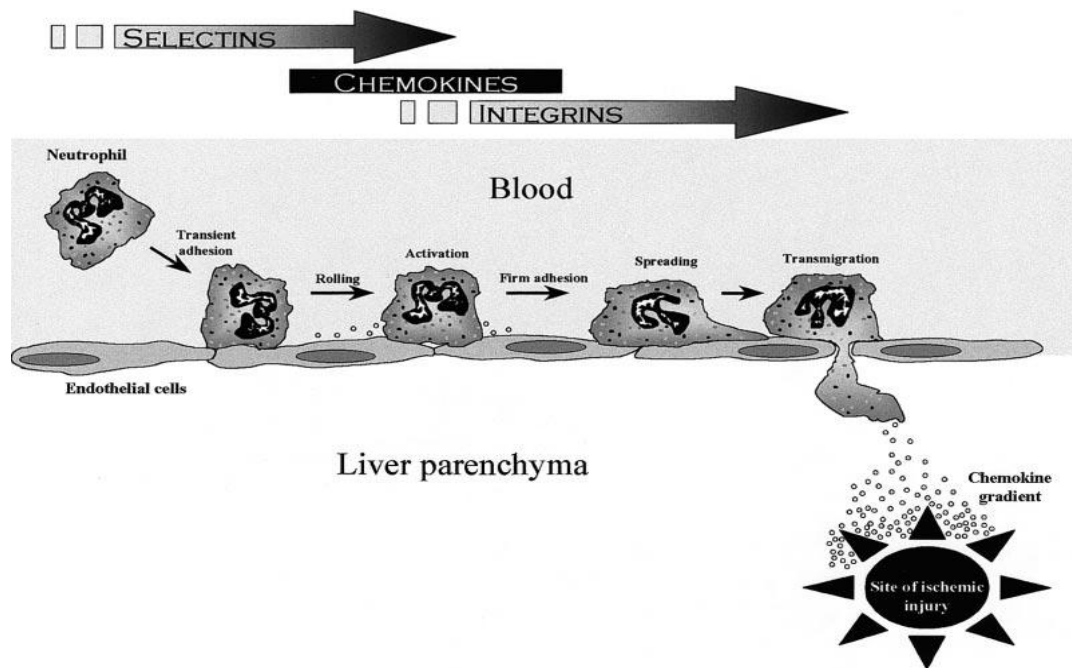


### TNF- $\alpha$

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma proteína de 26 kDa ligada à membrana celular, sendo que a sua clivagem pela enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE) gera uma molécula de 17 kDa que tipicamente circula como um homotrímero [Black *et al.*, 1997] e [Moss *et al.*, 1997]. O TNF- $\alpha$  é um poderoso mediador pro-inflamatório que em muitas respostas inflamatórias, incluindo a lesão de isquemia/reperfusão de vários órgãos, atua como um fator central na propagação da lesão [Frangogianis *et al.*, 2002] e [Seekamp *et al.*, 1993]. O TNF- $\alpha$  promove a resposta inflamatória primariamente pelo estímulo de vias de transdução de sinal que levam à indução da expressão de genes de mediadores inflamatórios secundários. Desta forma, o TNF- $\alpha$  ativa fatores de transcrição que regulam a expressão de genes inflamatórios incluindo o NF- $\kappa$ B, AP-1, bem como a p38 MAPK. Estes fatores de transcrição controlam a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (i.e., IL-1 e IL-6), quimiocinas (i.e., IL-8, MCP-1) e moléculas de adesão de células vasculares (i.e., seletinas e integrinas). Como em outras respostas inflamatórias agudas, o TNF- $\alpha$  é um mediador central na resposta à isquemia/reperfusão hepática. A produção de TNF- $\alpha$  no fígado não ocorre durante a isquemia, mas começa a aumentar poucos instantes após a reperfusão, no momento em que os níveis hepáticos de IL-12 são máximos [Lentsch *et al.*, 1999]. A importância do TNF- $\alpha$  na resposta inflamatória hepática tem sido bem descrita e sabe-se que o bloqueio deste mediador elimina a inflamação do fígado e a lesão hepatocelular [Colletti *et al.*, 1990]. Assim, o bloqueio do TNF- $\alpha$  previne não só a expressão das moléculas de adesão mas também das quimiocinas CXC, que são quimiotáticas para os neutrófilos [Colletti *et al.*, 1998] e [Lentsch *et al.*, 1998]. Desta forma, o TNF- $\alpha$  é considerado um mediador pró-inflamatório central durante a lesão de I/R hepática e é responsável pela propagação da resposta inflamatória por todos os tecidos lesados [Husted & Lentsch, 2006].

Ocorre um aumento na produção hepática de TNF- $\alpha$  logo após a reperfusão, fato este que tem poderosos efeitos não só no ambiente hepático local, mas também nas funções de órgãos mais distantes, mais notavelmente nos pulmões [Colletti *et al.*, 1990] e [Colletti *et al.*, 1998]. O TNF- $\alpha$  propaga a resposta inflamatória no fígado e para outros órgãos através da indução da expressão de moléculas de adesão nas células do endotélio vascular e estimulando a produção e liberação de quimiocinas CXC atrativas de neutrófilos. O aumento da expressão de moléculas de adesão nas células do endotélio vascular hepático apresenta múltiplos efeitos. A regulação de membros das selectinas, uma família de moléculas de adesão, incluindo a P-selectina resulta no aumento de plaquetas e da adesão de neutrófilos às células endoteliais do

fígado [Singh et al., 1999] e [Yadav et al., 1999]. No caso das plaquetas, a ligação destas às células endoteliais sinusoidais, mediada pelas selectinas, resulta na apoptose das células endoteliais e contribui para a disfunção do fígado [Yadav et al., 1999] e [Sindram et al., 2000]. No caso dos neutrófilos, estas interações iniciais de adesão, mediadas pelas selectinas, levam à formação de interações de adesão mais fortes entre integrinas (i.e., MAC-1) expressas nos neutrófilos e imunoglobulinas (i.e., ICAM-1) expressas nas células endoteliais [Jaeschke et al., 1993] e [Farhood et al., 1995]. A sucessão temporal dos eventos de adesão conduz ao rolamento e adesão dos neutrófilos, e à sua consequente transmigração do lúmen vascular para o interstício hepático (Figura.3) Em conjunto com as funções das moléculas de adesão celular, as quimiocinas CXC (i.e., IL-8 e homólogos) estão envolvidas no processo de recrutamento de neutrófilos. Durante a lesão de isquémia/reperfusão hepática a quente, a produção inicial de mediadores pro-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , induz a produção de quimiocinas CXC. A produção de quimiocinas pelo endotélio está envolvida na ativação inicial dos neutrófilos e na sua subsequente adesão firme, enquanto que as quimiocinas produzidas pelas células do parênquima formam um gradiente quimiotático, que serve como forma de recrutamento direto dos neutrófilos para o fígado lesado. Parecem haver diferenças seletivas na expressão das várias quimiocinas CXC em fígados isquémicos versus fígados não isquémicos que causam o recrutamento preferencial dos neutrófilos em fígados isquémicos [Lentsch et al., 1998]. As quimiocinas CXC são também reguladas noutros órgãos, incluindo os pulmões, e apresentam um importante papel no desenvolvimento de lesões noutros órgãos, após a I/R no fígado [Lentsch et al., 2000].



**Figura 3-** Mecanismos de adesão e transmigração de neutrófilos na microvasculatura hepática. Interações de adesão inicial entre os neutrófilos e o endotélio e subsequente rolamento de neutrófilos, mediado por selectinas. A produção de quimoquinas nas células endoteliais ativa os neutrófilos aderentes e facilita as interações firmes entre integrinas de leucócitos (Mac-1) e moléculas de adesão do endotélio (ICAM-1). Gradientes de quimoquinas no parênquima levam os neutrófilos diretamente para o local da lesão [Lentsch *et al.*, 2000].

### Moléculas de adesão

A adesão ao endotélio vascular, é um passo inicial na ativação e sequestração dos neutrófilos após a reperusão. A adesão de neutrófilos ao endotélio vascular (e às células parenquimatosas) é mediada por moléculas de adesão celular (CAMs) que são expressas tanto nos neutrófilos como nas células endoteliais. Existem quatro classes principais de moléculas de adesão: selectinas, caderinas, integrinas e moléculas de adesão semelhantes às imunoglobulinas (immunoglobulin-like) [Husted & Lentsch, 2006]. Quanto às selectinas, estas são expressas tanto pelos neutrófilos como pelas células endoteliais mediando a adesão entre estas células, e têm com função a captura dos leucócitos em circulação trazendo-os para a proximidade do endotélio. Existem três membros desta família: E-, L- e P- selectinas. A E-selectina é expressa nas células endoteliais, a L-selectina é expressa nos leucócitos, e a P-selectina é expressa nas células endoteliais e nas plaquetas. Estas moléculas de adesão ligam-se a glicanos expressos nos leucócitos e nas células endoteliais. Múltiplos estudos [Amersi *et al.*, 2002] e [Palma *et al.*, 1997] demonstraram que durante a lesão de I/R hepática, cada uma das selectinas é regulada e contribui para o recrutamento de neutrófilos para o fígado pós-isquêmico [Husted & Lentsch, 2006]. As integrinas são a

classe de moléculas de adesão expressas nos leucócitos e ligam-se às moléculas de adesão semelhantes às imunoglobulinas, expressas nas células endoteliais. A ligação destas moléculas de adesão umas às outras, medeiam a adesão forte dos leucócitos ao endotélio e facilitando a migração transendotelial dos leucócitos nos tecidos [Kishimoto *et al.*, 1989]. A especificidade da ligação dá-se entre diferentes membros de cada família, dirigindo diferentes tipos de leucócitos para diferentes locais, dependendo da molécula de adesão expressa quer no leucócito quer no endotélio de um dado tecido. No fígado, dois membros da família das imunoglobulinas, a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão de células vasculares (VCAM-1), parecem controlar a adesão e a transmigração da maioria dos neutrófilos [Jaeschke, 2003]. O bloqueio das integrinas e das moléculas de adesão semelhantes às imunoglobulinas, reduz drasticamente o tráfico de leucócitos na pós-isquemia hepática [Husted & Lentsch, 2006].

### 1.1.2.2 Fase final

A primeira fase da reperfusão é seguida por uma fase sub-aguda, a fase final ou tardia, a qual é caracterizada pela infiltração massiva de neutrófilos e pela produção de mais mediadores inflamatórios [Granger & Kubs, 1994]. Algumas famílias de moléculas de adesão celular (CAMs) estão envolvidas na acumulação de neutrófilos nos locais inflamados. Selectinas expressas na superfície das células endoteliais interagem com os seus recetores presentes nos neutrófilos, resultando na atração de neutrófilos para as vénulas, conduzindo à adesão firme dos neutrófilos à superfície das células endoteliais [Zhang *et al.*, 2007]. Os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), fazem parte da resposta imune inata aquando de uma infeção ou trauma tecidual. Devido à sua grande mobilidade e à capacidade de gerarem e libertarem substâncias citotóxicas, a principal função do recrutamento de neutrófilos para locais de inflamação é a eliminação rápida de microrganismos invasores e a remoção de células mortas. No fígado, tal como noutros órgãos, uma resposta inflamatória excessiva aumenta o risco de danificar os tecidos, o que acontece durante a isquémia/reperfusão, endotoxémia ou colestase obstrutiva [Jaeschke, 2006].

#### **1.1.2.2.1 Mecanismos de ativação dos neutrófilos e sua acumulação na vasculatura hepática**

Como resposta a uma grande variedade de substâncias inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ , quimiocinas CXC (ex.: IL-8, citocina derivada de queratinócitos, proteína-2 de macrófagos inflamatórios (MIP-2), citocina indutora de quimioatração de neutrófilos (CINC-1)), fatores complemento ativos (ex.: C<sub>5a</sub>), fator ativador de plaquetas (PAF) e outros), os neutrófilos acumulam-se na vasculatura do fígado. Todas as substâncias referidas aumentam a expressão de CD11b/CD18, um membro da família das integrinas  $\beta$ 2 das moléculas de adesão, e outros recetores presentes na superfície dos neutrófilos, causando a fusão de vesículas secretórias com a membrana celular. Além disso, componentes do NADPH oxidase são recrutados para a superfície celular de modo a aumentar a produção de ROS [El-Benna et al., 2005]. Quanto aos neutrófilos parcialmente ativados, estes são recrutados para as vénulas portal ou sinusoidais e pós-sinusoidais, sem causarem danos aos tecidos [Jaeschke, 2003] e Jaeschke & Smith, 1997], sendo que ao contrário da adesão venular, a acumulação dos neutrófilos nas vénulas sinusoidais não necessita de moléculas de adesão [Jaeschke, 2003] e Jaeschke & Smith, 1997]. Em geral, os neutrófilos responsáveis por danificar as células do parênquima provêm dos sinusoides [Jaeschke & Smith, 1997], pelo que se o revestimento do endotélio sinusoidal estiver intacto, o processo pelo qual os neutrófilos passam dos sinusoides para o parênquima requer o envolvimento de integrinas  $\beta$ 2 e os seus recetores presentes nas células endoteliais ICAM-1, integrinas  $\beta$ 2 e VCAM-1 [Jaeschke, 2003]. Por isto, considera-se que a extravasão para o parênquima é o pré-requisito para a citotoxicidade dos neutrófilos [Jaeschke, 2006].

#### **1.1.2.2.2 Sinais para extravasão de neutrófilos**

##### Quimiocinas CXC

As quimiocinas são uma família de pequenos péptidos, originalmente descritos como moléculas quimiotáticas responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para locais de infeção ou inflamação. A nomenclatura das quimiocinas baseia-se na configuração dos motivos de cisteína conservados junto do terminal amina. Atualmente conhecem-se quatro ramos da família das quimiocinas, CXC, CC, CX<sub>3</sub> e C (onde o X representa qualquer aminoácido). Geralmente, os membros da família CXC são quimiotáticos para neutrófilos, enquanto que os membros da família CC atraem primariamente monócitos e linfócitos [Husted & Lentsch, 2006].

Para que haja extravasão de neutrófilos, um dos pré-requisitos para a citotoxicidade, tem de haver um sinal vindo do parênquima o qual se caracteriza pela sobre-produção de quimiocinas CXC, nomeadamente as que contêm resíduos de ácido glutâmico-arginina-leucina (ELR), tais como a IL-8, MIP-2, KC ou CINC-1. Esta quimioatração de neutrófilos causa infiltração e extravasão destes para o fígado causando uma lesão no órgão [Jaeschke, 2003; Okaya & Lentsch, 2003]. O uso de anticorpos contra as quimiocinas CXC ou de antagonistas para os recetores de CXC, leva à atenuação da acumulação de neutrófilos e da lesão do fígado durante a isquémia/reperfusão [Jaeschke, 2006]. Estas descobertas, indicam que a formação das quimiocinas CXC nos hepatócitos pode ser, em certas circunstâncias, um sinal para a extravasão de neutrófilos. Alternativamente, pró-formas de quimiocinas CXC ligadas à matriz extracelular, podem ser clivadas e proporcionar um gradiente quimotático para neutrófilos. Contudo as quimiocinas nem sempre funcionam como mediadores quimioatrativos. Um exemplo é o caso do modelo de choque galactosamina/endotoxina (Gal/ET), em que as quimiocinas CXC MIP-2 e KC são formadas em quantidades substanciais no fígado mas não são responsáveis pela extravasão de neutrófilos [Dorman et al., 2005]. Assim sendo, as quimiocinas CXC apenas são relevantes para a extravasão de neutrófilos se geradas no tempo apropriado, se libertadas no local certo para formar o gradiente, e se formadas em quantidades suficientes relativamente a outros potenciais mediadores [Jaeschke, 2006].

### Apoptose

Em contraste com aquilo que se considera geralmente, que a morte celular por apoptose não aciona uma resposta inflamatória, a apoptose em excesso pode ativar a extravasão de neutrófilos no modelo de insuficiência hepática induzida por endotoxina e tratada com galactosamina, em murinos [Jaeschke et al., 1998]. Inibidores de caspases previnem, eficazmente, a apoptose hepatocelular e eliminam a extravasão de neutrófilos no parênquima. O modo como os neutrófilos reconhecem as células em apoptose é ainda desconhecido mas sabe-se que estas células conseguem gerar quimiocinas CXC as quais podem ser as responsáveis por este efeito. Assim, apesar dos inibidores de caspases impedirem a extravasão de neutrófilos, estes não apresentam nenhum efeito na formação de quimiocinas CXC. Contudo, fendas nas células endoteliais sinusoidais podem facilitar o contato direto de neutrófilos, através de pseudópodes, com hepatócitos em apoptose. A composição membranar alterada das células apoptóticas (expressão de fosfatidilserina na superfície membranar), pode

desencadear a migração, fagocitose e a formação de mediadores inflamatórios por fagócitos [Jaeschke, 2006].

### Necrose

Sabe-se que a morte celular por necrose conduz a uma resposta inflamatória e que no caso particular do fígado ocorre infiltração de neutrófilos. Até recentemente, permanecia pouco claro o que realmente iniciava esta resposta inflamatória não microbiana. Foi demonstrado, que a ativação precoce da cascata complemento, presumivelmente através da libertação do conteúdo celular das células danificadas pela isquémia, pode levar a ativação das células de Kupffer [Jaeschke, 2003] e [Jaeschke & Smith, 1997]. Um mediador libertado especificamente pelas células em necrose, mas não em apoptose, é o “high mobility group box 1” (HMGB1), um fator nuclear que está ligado à cromatina [Tsung et al., 2005b]. Anticorpos contra o HMGB1 atenuam a formação de citocinas pró-inflamatórias, reduzem a infiltração hepática de neutrófilos e protegem contra a lesão de I/R. O HMGB1 consegue ligar-se ao recetor Toll-like 4 (TLR4) das células de Kupffer, induzindo a geração de citocinas pró-inflamatórias [Tsung et al., 2005]. Assim, este fator nuclear promove a inflamação através da formação de citocinas, após ligação ao TLR4. Dadas estas descobertas, a libertação de HMGB1 das células necróticas parece ser um importante mediador na indução e manutenção da resposta inflamatória não microbiana após a lesão de isquémia/reperfusão [Jaeschke, 2006].

Tendo em conta que a formação de espécies reativas de oxigénio é uma consequência importante da ativação das células de Kupffer através de fatores complemento e do recrutamento de neutrófilos, diversos produtos da peroxidação lipídica (LPO) são formados durante a inflamação. Alguns destes produtos da LPO como, por exemplo, os aldeídos lipídicos, são potentes factores quimiotáticos para neutrófilos [Jaeschke, 2000]. Apesar de a LPO não ser considerada um mecanismo direto de lesão celular *in vivo*, observa-se um efeito protetor de quelantes de ferro e de antioxidantes hidrófobos, como a vitamina E, havendo uma diminuição da formação de produtos quimiotáticos da LPO e diminuindo assim, a resposta pelos neutrófilos [Jaeschke, 2000]. Para além dos mediadores produzidos pelas células lesadas, os neutrófilos ativados conseguem gerar fatores quimiotáticos potentes, como o leucotrieno B4 (LTB4), eicosanoide gerado em altas quantidades durante a fase tardia da reperfusão. Estes neutrófilos ativados conseguem ainda recrutar mais neutrófilos, agravando a inflamação [Jaeschke, 2006].

### 1.1.2.2.3 Stress oxidativo e morte celular induzida por neutrófilos

Apesar de haverem grandes evidências da importância das espécies reativas de oxigénio na lesão de reperfusão do fígado induzida por neutrófilos [Jaeschke, 2000] e [Jaeschke, 2003], experiências com co-culturas de neutrófilos ativados e hepatócitos identificaram apenas proteases como mediadores citotóxicos sem haver um envolvimento das ROS [Jaeschke & Smith, 1997] e [Ho et al., 1996]. Esta discrepância entre os mecanismos *in vivo* vs *in vitro*, sugerem um papel das ROS na morte celular mediada por proteases [Jaeschke & Smith, 1997]. Uma explicação para estas descobertas baseia-se no facto de as ROS *in vivo* serem necessárias para inativar anti-proteases do plasma, que podem interferir com a atividade das proteases produzidas pelos neutrófilos [Jaeschke & Smith, 1997]. Contudo, descobertas mais recentes lançam uma luz diferente neste processo. Em geral, os neutrófilos fagocitam pequenas partículas ou aderem a alvos maiores, usando integrinas  $\beta 2$  (CD18) e os seus recetores ICAM-1 nos hepatócitos [Jaeschke & Smith, 1997]. A ligação de CD11b/CD18 (Mac-1) aos neutrófilos ativa o NADPH oxidase que desencadeia *stress* oxidativo na vizinhança [Jaeschke, 2000] e [Jaeschke, 2003]. O radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) gerado pelo NADPH oxidase, dismuta-se em oxigénio e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) que são oxidantes altamente difusíveis. Mais ainda, o mieloperoxidase (MPO) libertado pelos grânulos de neutrófilos catalisa a formação a partir de  $H_2O_2$  de ácido hipocloroso (HOCl), outro oxidante bastante difusível e agente de cloração, o que dá origem a outras espécies tóxicas como as cloraminas [El-Benna et al., 2005]. Consistente com esta hipótese, existem evidências para um aumento dos níveis de glutathione oxidado (GSSG) nos tecidos, o que é um indicador do aumento dos níveis de  $H_2O_2$  durante a fase da isquémia/reperfusão induzida por neutrófilos [Hasegawa et al., 2005]. Observa-se ainda em hepatócitos após extravasão de neutrófilos em modelos de I/R um aumento intracelular de resíduos de clorotirosina [Gujral et al., 2003] e [Gujral et al., 2004], e de proteínas modificadas pelo ácido hipocloroso [Hasegawa et al., 2005], demonstrando um *stress* oxidativo específico derivado dos neutrófilos. Sendo que ratos deficientes em glutathione peroxidase 1 são mais susceptíveis a lesão induzida pelos neutrófilos do que animais *wild-type*, assume-se que os oxidantes derivados dos neutrófilos são fundamentais para a morte celular [Jaeschke et al., 1999]. Há portanto evidências diretas do envolvimento do NADPH oxidase e dos oxidantes derivados de neutrófilos, na morte celular mediada por neutrófilos durante a lesão de isquémia/reperfusão hepática [Jaeschke, 2006].

Sabe-se que os neutrófilos agravam e expandem uma lesão já existente, a questão é se os neutrófilos atacam na realidade células saudáveis ou se os hepatócitos normais



morrem como “espetadores inocentes”. Resultados recentes [Gujral *et al.* 2004] demonstram que a inibição do NADPH oxidase atrasa drasticamente a expansão da lesão celular, mas não previne a progressão da apoptose. Assim, os neutrófilos não matam células saudáveis, mas aceleram a morte das células em estágios iniciais de apoptose, sendo os hepatócitos muito resistentes à morte por *stress* oxidativo intracelular. Conciliando o fato de que os neutrófilos não atacam hepatócitos saudáveis, que têm uma grande capacidade de desintoxicação de ROS, com o fato que estratégias terapêuticas anti-neutrófilos podem ser altamente benéficas, foi proposto o seguinte conceito: uma célula exposta a níveis significativos de *stress*, pode sobreviver ou morrer por apoptose ou necrose. Se os neutrófilos sentirem as células sujeitas a *stress* através de mediadores quimiotáticos ou através do contacto celular direto, estes atacam e matam a célula. Deste modo, o recrutamento de neutrófilos para o fígado em resposta a danos celulares, pode limitar qualquer recuperação das células sujeitas a *stress*, ocorrendo expansão da área de necrose. Por outro lado, se o dano for muito grave e causar morte celular progressiva, o recrutamento de neutrófilos nunca terá um impacto negativo [Jaeschke, 2006].

#### **1.1.2.2.4 Morte celular induzida por proteases e neutrófilos**

As proteases provenientes de neutrófilos causam a morte direta de hepatócitos [Ho *et al.*, 1996] contudo, esta não é a maior contribuição das proteases no mecanismo de lesão pró-inflamatória. Os neutrófilos contêm um grande número de proteases importantes para a sua migração para locais da inflamação, e para a citotoxicidade provocada por estes. Estas proteínas estão localizadas na membrana e na matriz de certas vesículas e grânulos, e são libertadas em tempos diferentes [Fauschou & Borregaard, 2003]. Ao se exporem aos neutrófilos ligados à membrana ou aos mediadores inflamatórios da circulação sistêmica, as vesículas secretórias são mobilizadas. A fusão das vesículas com a membrana plasmática, aumenta rapidamente a capacidade de adesão dos neutrófilos às células endoteliais vasculares e aumenta a capacidade de resposta aos mediadores inflamatórios ou aos produtos bacterianos. Sendo que a matriz das vesículas inflamatórias contêm principalmente proteínas plasmáticas, a fusão destas vesículas não libertam proteínas citotóxicas [Fauschou & Borregaard, 2003]. Durante o processo de transmigração, as interações entre a integrina  $\beta 2$  e ICAM-1 desencadeiam a exocitose de grânulos de gelatinase com a libertação de metaloproteínases colagenolíticas, que degradam os componentes membranares da vasculatura basal, facilitando a extravasão dos neutrófilos. A mobilização de grânulos azurofílicos conduz à libertação da MPO, que

conjuntamente com o NADPH oxidase, gera uma grande quantidade de ROS. De forma a facilitar a migração dos neutrófilos e a morte das células alvo, as proteases serínicas, provenientes de neutrófilos estão também envolvidas na regulação do processo inflamatório. O TNF- $\alpha$  é gerado como uma pró-forma ligada à membrana, que necessita de ser clivado pela enzima conversora de TNF- $\alpha$ , para libertar o mediador biologicamente ativo. [Jaeschke, 2006].

Em resumo, infeções microbianas ou traumas tecidulares, despoletam uma resposta inflamatória no fígado com recrutamento de neutrófilos ativos para a vasculatura, em particular para os sinusoides hepáticos. Quando as células parenquimatosas geram um sinal quimiotático, os neutrófilos extravasam e aderem à célula alvo. [Jaeschke, 2006]. A adesão dos neutrófilos ao seu alvo, induz a degranulação total com a libertação de inúmeras proteases e a formação de ROS. Algumas destas ROS conseguem difundir-se para os hepatócitos e gerar *stress* oxidativo intracelular, que resulta na disfunção mitocondrial e na eventual morte celular por necrose [Jaeschke, 2006] sendo que, a morte dos hepatócitos pelos neutrófilos, é dependente do contacto celular direto via CD11/CD18 e ICAM-1 [Lentsch et al., 2000]. Alguns dos proteases, ajudam no processo de morte celular, enquanto outros podem gerar mais mediadores pró-inflamatórios. [Jaeschke, 2006]. Proteases serínicas, como o elastase e o catepsina G, danificam diretamente os componentes da membrana dos hepatócitos, enquanto que as metaloproteínases degradam essencialmente a membrana basal e os componentes da matriz [Lentsch et al., 2000]. Além disso, a libertação de mediadores (ex.: HMGB1, aldeídos lipídicos) das células necróticas, e a formação de fatores quimiotáticos pelos neutrófilos por eles ativados, vão ativar e recrutar mais neutrófilos para o local da inflamação, agravando ainda mais a lesão do fígado [Jaeschke, 2006].

### 1.2 Regulação da resposta inflamatória hepática

O resultado de respostas inflamatórias agudas é determinado pelo balanço entre mediadores pró- e anti-inflamatórios. Na resposta inflamatória do fígado à I/R os mediadores anti-inflamatórios endógenos que parecem ser mais importantes são a IL-6, IL-10 e o inibidor de protease secretora de leucócitos (SLPI), os quais são induzidos durante ou logo após a isquémia hepática [Ghosh et al., 1998] e [Zwacka et al., 1998]. No caso da IL-10 e do SLPI, os mecanismos pelos quais estes mediadores inibem a resposta inflamatória parecem estar diretamente relacionados com a inibição do fator

de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B [Ghosh et al., 1998] e [Zwacka et al., 1998]. Como referido anteriormente, o NF- $\kappa$ B é um regulador primário da expressão de genes de um vasto número de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas CXC e moléculas de adesão celular vascular) e é ativado durante a lesão de isquemia e reperfusão hepática [Lentsch *et al.*, 2000]. A aplicação de IL-10 e SLPI em modelos experimentais de I/R hepática, bloqueia a ativação do NF- $\kappa$ B no fígado, impedindo a degradação do I $\kappa$ B, e reduz a expressão do TNF- $\alpha$ , de quimiocina CXC e da proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2), um homólogo da IL-8 em murinos. Estes efeitos são acompanhados por uma grande redução na acumulação de neutrófilos no fígado e atenuando de grande forma a lesão hepatocelular. Apesar destes resultados sugerirem que o NF- $\kappa$ B pode ser um componente integral da resposta inflamatória hepática, outros resultados indicam que a ativação do NF- $\kappa$ B é necessária para a regeneração do fígado após um transplante [Gu *et al.*, 2004]. Num estudo de Gu *et al.*, de 2004, em que se pesquisou o efeito da pirrolidina ditiocarbomato (PDTC) na inibição do NF- $\kappa$ B, estabeleceu-se a ativação do NF- $\kappa$ B em tecido hepático ao longo do tempo por meio da avaliação dos níveis das subunidades p65/p50 em extratos nucleares do fígado. No grupo de controlo, a ativação do NF- $\kappa$ B aumentou ligeiramente 0,5 h após a reperfusão, e marcadamente 1 h após a reperfusão, atingindo um máximo 2 horas após a reperfusão e diminuiu 4 h após a reperfusão [Gu *et al.*, 2004]. Assim, o NF- $\kappa$ B é ativado após o transplante de fígado e este fato está associado com a redução da apoptose dos hepatócitos e com a lesão do fígado. Sob estas condições experimentais, o bloqueio do NF- $\kappa$ B leva ao aumento da apoptose dos hepatócitos e da lesão hepática. Por isto, parece que a ativação do NF- $\kappa$ B desempenha um duplo papel oposto, atuando tanto como um indutor da inflamação aguda do fígado, tanto como um promotor da regeneração do fígado [Lentsch *et al.*, 2000].

### **1.2.1 Mediadores anti-inflamatórios**

#### IL-6

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina de fase aguda produzida por fagócitos mononucleares, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, que desempenha um papel central na hematopoiese, na defesa do hospedeiro e na inflamação [Van Snick, 1990]. Níveis clínicos de IL-6 têm sido relacionados com situações de traumatismos e rejeição de órgãos transplantados [Waage et al., 1989; Kita et al., 1994]. O fígado é a maior fonte de IL-6 mas também o seu primeiro local de depuração, sendo que em modelos animais de isquemia/reperfusão hepática, a expressão de IL-6 encontra-se

elevada dentro da primeira hora de reperfusão [McCurry et al., 1993]. Durante a lesão de I/R hepática clínica, a expressão de IL-6 apresenta-se elevada e inversamente relacionada com a produção de TNF- $\alpha$ , sugerindo que a IL-6 pode ter um efeito hepatoprotector através da regulação do TNF- $\alpha$  [Husted & Lentsch, 2006]. Estes resultados estabeleceram que a IL-6 endógena é uma citocina regulatória muito importante que tenta controlar e diminuir a resposta inflamatória hepática. Animais tratados com IL-6, diminuíram a expressão de TNF- $\alpha$ , reduzindo a acumulação de neutrófilos e diminuindo a lesão no fígado em diversos síndromes isquémicas [Husted & Lentsch, 2006].

Outro aspeto importante da IL-6 na fisiologia do fígado é o seu papel como fator de regeneração. A ligação da IL-6 ao seu recetor nos hepatócitos resulta na ativação e na translocação nuclear do fator de transcrição, transdutor de sinal e ativador da transcrição-3 (STAT3). A ativação do STAT3 resulta na expressão de proteínas mitogénicas e anti-apoptóticas que contribuem para a recuperação e regeneração da massa hepatocelular. Assim, um efeito adicional da IL-6 no contexto da lesão de I/R parece estar relacionado com a sua capacidade de promover o restabelecimento e a regeneração precoce, após a isquémia [Husted & Lentsch, 2006].

### IL-10

A IL-10 foi originalmente descrita como um produto das células B, as quais apresentam um efeito proliferativo nos linfócitos T. Mais tarde, mostrou-se que a IL-10 é produzida por uma variedade de células inflamatórias e tem efeitos imunomodulatórios nos macrófagos [Bogdan et al., 1991] e [Fiorentino et al., 1991]. No fígado, a IL-10 é expressa em vários cenários patológicos, incluindo a isquémia/reperfusão [Thompson et al., 1998] e [Kato et al., 2003]. Atualmente considera-se que a fonte hepática desta interleucina são as células de Kupffer e que a IL-10 atua de forma autócrina de forma a diminuir a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (ex.: TNF- $\alpha$  e MIP-2) [Oreopoulos et al., 2004]. Contudo, o papel exato das IL-10 endógenas na regulação da lesão de isquémia hepática permanece, apenas, especulativo [Husted & Lentsch, 2006], uma vez que resultados atuais sugerem que a IL-endógena, enquanto expressa em níveis relativamente altos no fígado após isquémia/reperfusão, não consegue controlar significativamente esta resposta [Kato et al., 2003]. Apesar da incapacidade da IL-10 endógena em regular a resposta inflamatória induzida pela isquémia/reperfusão, há sólidas evidências de que a IL-10 exógena consegue inibir potencialmente a lesão no fígado após-isquémia [Yoshidome et al., 1999]. O mecanismo pelo qual a IL-10 exógena é capaz de reduzir a lesão está relacionado com os seus efeitos no NF- $\kappa$ B. Sabe-se agora que a IL-10

inibe a atividade do complexo cinase da I $\kappa$ B (IKK) [Schottelius *et al.*, 1999]. Isto resulta na preservação da expressão da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  dentro do citoplasma e diminui a ativação e a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B [Lentsch *et al.*, 1997]. Tem-se mostrado que a IL-10 inibe a ativação do NF- $\kappa$ B tanto no órgão lesado como em órgãos remotos [Yoshidome *et al.*, 1999]. Esta inibição do NF- $\kappa$ B conduz à redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , quimiocinas CXC e moléculas de adesão celular. Estes efeitos reduzem a infiltração de neutrófilos no órgão lesado, melhorando assim a preservação celular do parênquima. Parece haver uma dicotomia tal que a IL-10 endógena não confere efeitos protetores durante a lesão de isquemia/reperfusão, enquanto que a manipulação farmacológica (administração exógena) de IL-10 parece ser altamente hepatoprotetora [Husted & Lentsch, 2006].

### SLPI

O inibidor de protease de leucócito secretor (SLPI) é uma proteína de 12 kDa expressa constitutivamente por uma variedade de células, incluindo células fagocíticas, células serosas das glândulas salivares, células epiteliais dos pulmões e células endoteliais vasculares pulmonárias [Tomee *et al.*, 1998]. A SLPI inibe potencialmente enzimas com atividade de proteases serínicas, incluindo a elastase dos neutrófilos, a catepsina G, a tripsina e a quimotripsina. A SLPI apresenta ainda funções relacionadas ou não com a sua ação inibidora de proteases, incluindo a diminuição da entrada do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) para as células CD4<sup>+</sup> e a supressão da expressão de metaloproteínases da matriz extracelular [Wahl *et al.*, 1997]. A sobre-expressão induzida de SLPI em linhas celulares de macrófagos reduz a produção de lipopolíossidos induzida pela expressão de TNF- $\alpha$  [Husted & Lentsch, 2006]. Houve apenas um estudo que examinou o papel da SLPI durante a I/R hepática. Neste estudo [Lentsch *et al.*, 1999] determinou-se a expressão constitutiva de mRNA de SPLI em fígados não lesados e, após isquemia e reperfusão hepática, descobriu-se que a expressão de SLPI no fígado aumenta até às 8 horas. Os hepatócitos têm sido sugeridos como a principal fonte de SLPI, fato que até agora não foi estudado. O bloqueio de SLPI endógeno com anticorpos aumenta os níveis de TNF- $\alpha$  e de quimiocinas e a acumulação de neutrófilos no fígado [Husted & Lentsch, 2006]. Quanto à administração de SLPI exógeno, esta atenua grandemente a lesão de isquemia/ reperfusão no fígado e também diminui a ativação de NF- $\kappa$ B [Lentsch *et al.*, 1999]. Sendo que a expressão de TNF- $\alpha$  e de algumas quimiocinas é controlada ao nível do gene pelo NF- $\kappa$ B, sugere-se que o SLPI exerce a sua ação através desta via. De fato, num modelo de rato com lesão aguda no pulmão, o SLPI demonstrou estabilizar e prevenir a degradação da proteína inibitória do NF- $\kappa$ B, a I $\kappa$ B- $\alpha$ . Outros

estudos neste modelo animal, sugerem que a atividade inibitória do SLPI sobre o NF- $\kappa$ B pode estar diretamente relacionada com os seus efeitos inibitórios nas proteases serínicas. Assim, o SLPI aparenta ser um poderoso inibidor da lesão pós-isquêmica do fígado conduzindo os seus efeitos para as enzimas dos neutrófilos e para a modulação da ativação do NF- $\kappa$ B [Husted & Lentsch, 2006].

### 1.3 Sistema de defesa antioxidante

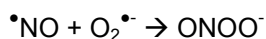
O *stress* oxidativo (ver página 26) é um fator importante no desenvolvimento de muitas condições patológicas tais como inflamação, cancro, envelhecimento e resposta de órgãos a situações de isquemia/reperfusão. Os seres humanos têm desenvolvido um complexo sistema antioxidante para eliminar ou atenuar o *stress* oxidativo [Glantzounis *et al.*, 2005].

A reoxigenação de um fígado isquémico conduz à produção de inúmeras espécies reativas de oxigénio (ROS) e de espécies reativas de azoto (RNS) sendo que em baixas concentrações, as ROS e as RNS apresentam um papel importante como mediadores no metabolismo e na transdução de sinal de uma célula normal. Contudo, quando produzidas em altas concentrações estas espécies químicas podem ser prejudiciais [Glantzounis *et al.*, 2005].

#### 1.3.1 Espécies reativas de oxigénio e I/R

Um “radical” é definido como qualquer átomo ou (bio)molécula que contém eletrões desemparelhados. Estes eletrões influenciam a reatividade química, fazendo com que o radical seja mais reativo que o correspondente não radical. Assim, apesar do dióxigénio ( $O_2$ ) ser a molécula biológica mais importante para sustentar a vida aeróbia, é também a principal fonte para a formação de outros radicais livres devido à sua alta disponibilidade [Glantzounis *et al.*, 2005]. Entre os radicais biologicamente relevantes incluem-se o anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) e o óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ). Em condições normais, cerca de 1 a 3% do oxigénio que é metabolizado nos mitocôndrios é convertido no radical  $O_2^{\bullet-}$ . Outras espécies intermediárias do metabolismo do  $O_2$  e do  $^{\bullet}NO$  não são radicais, pois não contêm eletrões desemparelhados. Estas espécies intermediárias, juntamente com as espécies radicalares são conhecidas por espécies reativas de oxigénio (ROS) ou de azoto (RNS). Os exemplos mais representativos de ROS que não são radicais são o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso, enquanto que das RNS é o

peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). O peroxinitrito pode ser formado quando existe a produção simultânea de óxido nítrico e do anião superóxido (Equação 1).



**Equação 1**

A toxicidade para o tecido gerada pelo superóxido é baseada na sua reatividade direta com inúmeros tipos de moléculas biológicas (tipicamente proteínas de Fe/S) e na sua dismutação para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vestígios de iões metálicos (principalmente ferro e cobre) reagem com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no que é conhecido como a reação de Fenton (Equação 2) para produzir o radical hidroxilo, HO<sup>•</sup>, o qual consegue clivar ligações covalentes nas proteínas, glícidos e DNA e levar à peroxidação dos lípidos membranares, destruindo as membranas celulares [Glantzounis *et al.*, 2005].



**Equação 2**

A lesão hepática induzida por I/R é causada, parcialmente, por ROS e RNS. Há evidências de que durante a I/R hepática ocorre formação e libertação de ROS e RNS com o concomitante consumo de antioxidantes endógenos e morte celular por apoptose ou necrose. Apesar de as fontes exatas de geração de ROS na I/R do fígado estarem ainda sob investigação, tem-se atribuído um papel chave para a NADPH oxidase, o sistema xantina/XOR, e os mitocôndrios. Apesar de a XOR ter sido considerada como a principal fonte de *stress* oxidativo pós-isquémico no fígado, recentes evidências sugerem que a XOR desempenha um papel menor quando comparado com os mitocôndrios. Os mitocôndrios são o local de produção de grandes quantidades de radical superóxido e, portanto, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobretudo em condições de *stress* oxidativo. É este *stress* que conduz, finalmente, à formação do poro de permeabilidade transitória e à dissipação do potencial de membrana mitocondrial que causam morte celular [Glantzounis *et al.*, 2005]. As ROS e RNS apresentam um papel importante nas vias de transdução de sinal que coordenam a resposta inflamatória corporal após a lesão de I/R do fígado. Estas espécies estão envolvidas como mediadores na produção de substâncias que regulam o fluxo sanguíneo no fígado e na sua regeneração. Em ratos transgênicos com sobre-expressão de enzimas antioxidantes, observa-se uma diminuição da ploidia celular durante a regeneração do fígado, o que sugere a importância das ROS no controlo do ciclo celular. As ROS induzem também genes relacionados com a resposta ao *stress* tal como a heme

oxigenase (HO)-1, a qual conduz à formação do antioxidante biliverdina, do vasodilatador monóxido de carbono e de  $\text{Fe}^{2+}$  [Glantzounis *et al.*, 2005].

### 1.3.2 Óxido nítrico e I/R

O óxido nítrico ( $\text{*NO}$ ) é um radical sintetizado via oxidação da L-arginina numa reação catalisada pelo óxido nítrico sintase (NOS) [Moncada & Higgs, 1993]. Existem duas principais isoformas de NOS no fígado: NOS endotelial e NOS induzível (iNOS). O NOS endotelial é expresso constitutivamente e a sua atividade é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina [Vasquez-Vivar *et al.*, 1998]. O iNOS é sintetizado pelas células endoteliais, hepatócitos e células de Kupffer sendo a sua atividade independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{*NO}$  é uma molécula lipófila que se difunde para células adjacentes e entra no citosol, onde ativa o guanilato ciclase através da ligação ao ferro do centro hémico, resultando num aumento intracelular dos níveis de guanosina monofosfato cíclica [Schmidt *et al.*, 1993]. Desta forma, muitas das ações biológicas do  $\text{*NO}$  são mediadas através do sistema guanilato ciclase/ guanosina monofosfato cíclica [Glantzounis *et al.*, 2005].

Em condições fisiológicas apenas o NOS endotelial está presente no fígado e o  $\text{*NO}$  produzido em baixos níveis regula a perfusão hepática, previne a adesão de plaquetas, trombose, acumulação de células polimorfonucleares e a secreção de mediadores inflamatórios. O  $\text{*NO}$  induz também a vasodilatação ao nível dos locais sinusoidais e pré-sinusoidais, de modo a manter o equilíbrio com os vasoconstritores como a endotelina [Glantzounis *et al.*, 2005]. A indução do iNOS pode ter efeitos protetores ou tóxicos, estando estes dependentes do tipo de insulto, dos níveis e da duração da expressão do iNOS e da simultânea produção do radical superóxido [Glantzounis *et al.*, 2005]. No caso particular de I/R hepática, o aumento da expressão do RNA mensageiro do iNOS inicia-se uma hora após a reperfusão havendo um aumento da atividade deste enzima cinco horas após a reperfusão. A literatura sobre os efeitos do iNOS na lesão de I/R hepática continua ambivalente. Assim, alguns estudos sugerem que a expressão do iNOS tem efeitos prejudiciais para a função hepática, enquanto outros sugerem ser benéfica ou não apresentar nenhum efeito [Glantzounis *et al.*, 2005]. Os efeitos tóxicos do  $\text{*NO}$  estão relacionados com a produção de peroxinitrito, resultante da reação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e do  $\text{*NO}$ . O peroxinitrito causa lesão celular através de diversas vias: iniciação da peroxidação lipídica, inibição direta das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, inibição da atividade da ATPase de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ou ainda a modificação oxidativa de proteínas, tal como a formação de nitrotirosina [Glantzounis *et al.*, 2005]. Contudo, para saber se o  $\text{*NO}$  atua como um



agente citoprotector ou citotóxico, tem de se ter em conta diversos fatores, como a razão  $\bullet\text{NO}/\text{O}_2\bullet$ , os níveis hepáticos de glutathione reduzido (GSH), e duração da isquemia [Glantzounis *et al.*, 2005].

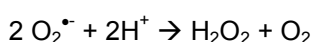
### 1.3.3 Defesas antioxidantes

Um antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, em comparação com os substratos oxidáveis, atrasa ou impede significativamente a oxidação desses substratos [Gutteridge, 1995]. Os antioxidantes endógenos são maioritariamente substâncias de baixa massa molecular, capazes de impedir a iniciação de danos oxidativos ou de limitar a sua propagação, e também enzimas que catalisam a conversão ou remoção das ROS e RNS. O equilíbrio redox celular em condições normais está sob um controlo apertado. Contudo, quando as ROS e RNS são produzidas em níveis que não conseguem ser combatidas pelo sistema antioxidante endógeno, ocorre um desequilíbrio que pode conduzir a danos moleculares chamado *stress* oxidativo. Esta condição pode levar à desregulação de vias sob regulação redox e à oxidação de lípidos, proteínas, glícidos e ácidos nucleicos [Glantzounis *et al.*, 2005].

O sistema antioxidante é de extrema importância para os seres vivos e permite-lhes usarem o  $\text{O}_2$  para produção de energia, controlando simultaneamente os efeitos prejudiciais do  $\text{O}_2$ . A composição das defesas antioxidantes difere de tecido para tecido e de célula para célula num certo tecido. Além do mais, diferentes órgãos contêm diferentes concentrações de antioxidantes, e por esta razão existe variabilidade na resistência da I/R de órgão para órgão. Por exemplo, os hepatócitos tendem a ser resistentes à lesão causada pelas ROS e RNS, desde que estes contenham elevadas concentrações celulares de GSH, superóxido dismutase (SOD), catalase e antioxidantes hidrófobos [Glantzounis *et al.*, 2005]. Contudo, há evidências de que os antioxidantes operam num sistema coordenado [Glantzounis *et al.*, 2005], como representado na figura 4. Os antioxidantes são uma família heterogénea de moléculas sendo que algumas classificações usadas até agora têm em conta a sua origem (natural ou sintética), a natureza (enzimática ou não enzimática), as propriedades (hidrófila ou hidrófoba), o mecanismo (remoção catalítica das ROS, quelatação metálica, ou captura de ROS), e o seu local de ação (intracelular, membranas ou extracelular) [Glantzounis *et al.*, 2005].

### 1.3.3.1 Antioxidantes intracelulares

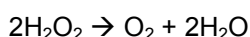
As defesas antioxidantes intracelulares incluem diversos enzimas como os superóxido dismutases (SODs), o catalase, os glutathione peroxidases (GPXs) e outros tiol peroxidases conhecidos por peroxiredoxinas, glutathione redutase (GSH), sistema da tioredoxina/tiorredoxina redutase e do glutaredoxina, e o enzima heme oxigenase (HO) [Glantzounis *et al.*, 2005]. Estas defesas celulares incluem igualmente antioxidantes não enzimáticos como o GSH, a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e o ascorbato. No que diz respeito aos SODs, estes catalisam a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogénio e oxigénio (Equação 3).



Equação 3

Existem três formas de SOD com diferentes localizações intracelulares. Aqueles que contêm cobre e zinco estão localizadas no citosol ou extracelularmente, usualmente no lado de fora da membrana plasmática onde interagem com componentes da matriz extracelular. Existe um SOD que contém manganês e localiza-se na matriz mitocondrial [Glantzounis *et al.*, 2005]. Foi observado que a atividade enzimática dos enzimas Mn-SOD e Cu,Zn-SOD aumenta no plasma após transplantes hepáticos e também que o aumento de atividade dos glutathione peroxidases diminui a peroxidação lipídica [Zhang *et al.*, 2007].

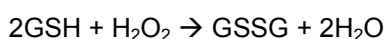
O produto da reação de dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , é um oxidante fraco e é relativamente estável. Contudo, ao contrário do radical superóxido, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  devido ao fato de não possuir carga, consegue difundir-se rapidamente através da membrana celular. Existem três principais sistemas enzimáticos que conseguem controlar os níveis intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Um deles é a hemoproteína catalase (CAT). O catalase está presente em todos os órgãos principais do corpo e especialmente concentrada no fígado. Ele catalisa a dismutação do peróxido de hidrogénio a oxigénio e água (Equação 4) [Glantzounis *et al.*, 2005].



Equação 4

O catalase localiza-se principalmente nos peroxissomas das células de mamífero. Após uma injeção intravenosa de  $^{111}\text{In}$ -CAT (catalase marcada com  $^{111}\text{In}$ ), observa-se que esta é recuperada principalmente das células parenquimatosas (PC) do fígado, e que há uma diminuição dos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e

de alanina aminotransferase (ALT) o que demonstra um efeito profilático da CAT durante a I/R hepática [Zhang *et al.*, 2007]. O segundo sistema capaz de controlar os níveis de  $H_2O_2$  consiste nas glutathione peroxidases (GPxs). Este grupo inclui diferentes isoformas, sendo as mais importantes a celular (GPX1), que se situa no citosol e matriz mitocondrial, a gastrointestinal (GPX2), extracelular (GPX3) e a que atua em hidroperóxidos de fosfolípidos (GPX4) [Glantzounis *et al.*, 2005]. As GPxs catalisam a redução do  $H_2O_2$ , e hidroperóxidos de lípidos (ROOH) a  $H_2O$  (e ROH) por oxidação do GSH à sua forma oxidada (GSSG) (Equação 5 e 6) [Zhang *et al.*, 2007].



**Equação 5**

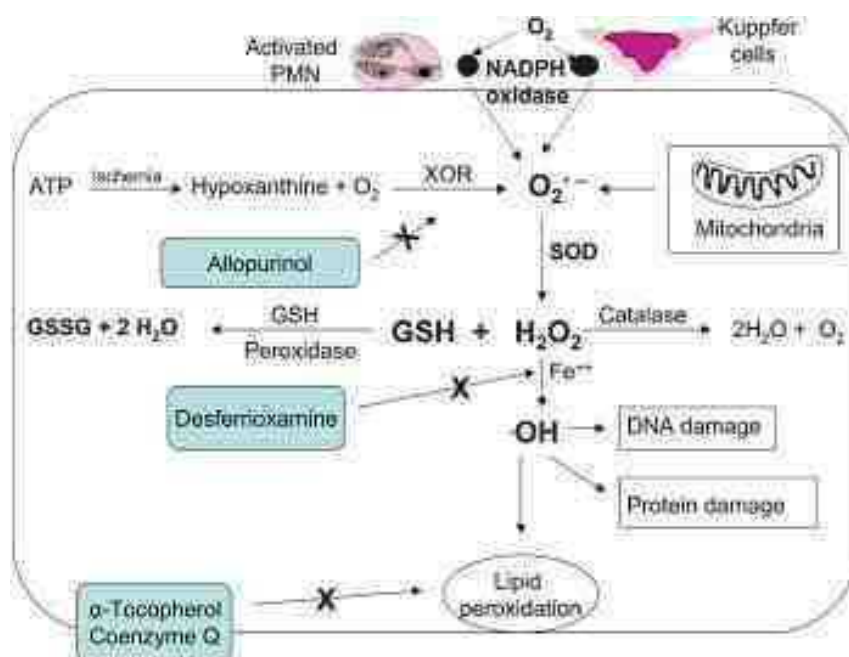


**Equação 6**

Desta forma, a eficácia do GPX é dependente da disponibilidade intracelular da GSH e da capacidade da célula em reduzir a sua forma persulfureto (GSSG) [Zhang *et al.*, 2007]. Assim o glutathione redutase (GR) é um enzima importante neste sistema ao catalisar a regeneração do GSH a partir do GSSG, usando como redutor o fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reduzido (NADPH). O GSH é um tripéptido presente em concentrações da ordem do milimolar em praticamente todas as células, sendo um importante componente do sistema antioxidante endógeno. A principal função do GSH é agir como co-substrato dos glutathione peroxidases para reduzir os hidroperóxidos gerados intracelularmente. O GSH também captura diretamente as ROS e RNS e está envolvido noutros processos metabólicos como na prevenção da oxidação dos grupos sulfidrílo das proteínas e na quelatação de iões de cobre. O GSH está ainda presente em fluidos extracelulares em concentrações na ordem dos micromolar [Glantzounis *et al.*, 2005].

O terceiro sistema de combate ao  $H_2O_2$  é formado por tiol peroxidases da família das peroxirredoxinas que reduzem o  $H_2O_2$  e outros hidroperóxidos a água e álcool, respetivamente, usando equivalentes redutores. Estes equivalentes redutores derivam do NADPH através do sistema da tiorredoxina/tiorredoxina redutase. As peroxirredoxinas localizam-se no citoplasma (peroxirredoxina I e II) e no mitocôndrio (peroxirredoxina III) [Glantzounis *et al.*, 2005]. Foi demonstrado que tanto o Prx-I e Prx-II são induzidos pelo processo de transplante, protegendo as células contra danos oxidativos em culturas celulares. Assim, os peroxirredoxinas podem tornar-se uma terapia útil e promissora para a I/R no transplante hepático [Zhang *et al.*, 2007]. A tiorredoxina é um polipéptido concentrado especialmente no citosol (tiorredoxina 1), mas também se encontra nos mitocôndrios (tiorredoxina 2) e contem dois grupos

sulfidrilos adjacentes na sua forma reduzida, que são convertidos a persulfureto na sua forma oxidada [Glantzounis *et al.*, 2005]. O heme oxigenase (HO) é um enzima do retículo endoplasmático, que catalisa a quebra do heme a biliverina, com a libertação de iões  $\text{Fe}^{2+}$  e monóxido de carbono. Caracterizaram-se três isoformas do HO: HO-1, que é altamente induzida em situações de inflamação e *stress* oxidativo; e HO-2 e HO-3 que são constitutivamente expressos. A indução de HO-1 protege as células contra o *stress* oxidativo, através do controlo dos níveis intracelulares de heme livre (um prooxidante), produzindo biliverdina (um antioxidante) e melhorando a microcirculação via libertação de monóxido de carbono [Glantzounis *et al.*, 2005].



**Figura 4-** Mecanismos básicos do sistema antioxidante endógeno. XOR e a mitocôndria são as principais fontes intracelulares de produção de ROS. As células de Kupffer e os neutrófilos ativados são as principais fontes de produção extracelular de ROS durante a fase precoce e tardia da reperfusão, respetivamente. Os principais enzimas antioxidantes intracelulares são o SOD, catalase e GSH peroxidase. O  $\alpha$ -tocoferol e a coenzima Q são os principais antioxidantes presentes na membrana celular. PMN- célula polimorfonuclear; NADPH- fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina; GSH e GSSG- glutatíon reduzido e oxidado, respetivamente [Glantzounis *et al.*, 2005].

### 1.3.3.2 Antioxidantes extracelulares

A principal defesa antioxidante extracelular inclui as proteínas de ligação a metais [Betteridge, 2000]. Os iões de ferro e cobre livres promovem os danos provocados pelos radicais livres, acelerando a peroxidação lipídica e catalisando a formação de

radicais hidroxilo. O corpo está protegido contra estes efeitos potencialmente adversos através das proteínas de ligação a metais que asseguram que estes metais sejam mantidos num estado não reativo. A transferrina e a lactoferrina ligam iões ferro, enquanto a ceruloplasmina e a albumina ligam-se a iões cobre. A hemoglobina e a mioglobina são normalmente proteínas intracelulares que quando expostas a *stress* oxidativo, são degradadas e libertam tanto o grupo heme como os iões ferro que têm capacidade de estimular a peroxidação lipídica. A hemoglobina liga-se a proteínas conhecidas como haptoglobinas e a proteínas ligantes de heme tal como a hemopexina, diminuindo a eficácia destas substâncias na estimulação da peroxidação lipídica [Glantzounis *et al.*, 2005]. Para além do papel principal das proteínas de ligação a metais como protetoras extracelulares do *stress* oxidativo, existem várias moléculas de baixa massa molecular sintetizadas *in vivo* e que apresentam propriedades antioxidantes. As substâncias mais importantes são a bilirrubina, a melatonina, o ácido lipóico, a coenzima Q, o ácido úrico e a melatonina [Glantzounis *et al.*, 2005].

Também um vasto número de componentes presentes na dieta apresenta efeitos antioxidantes *in vivo*. Os mais importantes são o ácido ascórbico (vitamina C), de carácter hidrófilo, e o  $\alpha$ -tocoferol, hidrófobo, (a forma mais activa da vitamina E), que são componentes importantes do sistema antioxidante humano. O ascorbato é necessário *in vivo* como cofator para várias enzimas, em que as mais conhecidas são a prolina hidroxilase e a lisina hidroxilase, ambas envolvidas na biossíntese do colagénio. A sua principal propriedade é atuar como agente redutor, conseguindo captar muitos radicais, como o radical  $O_2^{\bullet-}$ , radical  $HO^{\bullet}$ , radical peroxilo, radical tiólo, radicais de óxido de enxofre e compostos não radicalares como o peroxinitrito [Halliwell & Gutteridge, 1990] e [Birlouez-Aragon & Tessier, 2003]. O  $\alpha$ -tocoferol é um antioxidante altamente eficaz quando incorporado no núcleo lipídico das membranas celulares que tem a capacidade de capturar radicais peroxilo e portanto, de interromper as cadeias de reações de propagação da peroxidação lipídica [Glantzounis *et al.*, 2005].

Os carotenóides são um grupo de pigmentos corados que estão generalizados nos tecidos das plantas. São precursores da vitamina A e a principal fonte de vitamina A nos humanos, exercendo a sua função antioxidante através da captura de radicais livres [Glantzounis *et al.*, 2005]. Outro grupo de antioxidantes são os fenóis das plantas. As plantas contêm uma enorme gama de fenóis, incluindo tocoferóis, tocotrienóis, flavonóides, antocianinas e fenilpropanóides que inibem a peroxidação pela captura de radicais peroxilo interrompendo as reações em cadeia. Para além

disso, captam as ROS e RNS, como o radical  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  e o ácido hipocloroso, e atuam como quelantes de metais [Glantzounis *et al.*, 2005].

Desta forma, existe um sinergismo entre os diferentes antioxidantes, os quais estão ligados uns aos outros através de uma relação sistemática como parte da rede de antioxidantes. Estudos recentes em lesões de I/R do miocárdio sugerem que os antioxidantes hidrófilos (ácido ascórbico, GSH) são consumidos primeiro, seguidos dos antioxidantes hidrófobos (vitamina E) [Glantzounis *et al.*, 2005].

### 1.3.4 Terapia Antioxidante

Atualmente não existem agentes terapêuticos clinicamente disponíveis especificamente para a prevenção ou tratamento da lesão de IR. A única estratégia estabelecida para limitar a lesão de IR é a reperfusão precoce do tecido isquêmico. Apesar de uma multiplicidade de sucesso em intervenções experimentais de modo a reduzir a lesão de IR, muito poucas têm sido traduzidas para a prática clínica.

Várias terapias farmacológicas e não farmacológicas podem ajudar a reduzir a lesão de isquemia/reperfusão. Por exemplo, quanto a terapias não farmacológicas, várias estratégias cirúrgicas podem diminuir a lesão em doentes, tais como o pré-condicionamento isquêmico, o pós-condicionamento e o pré-condicionamento remoto. O melhoramento das soluções de preservação hipotérmica tem sido fundamental no aumento do sucesso precoce do enxerto. Alguns agentes farmacológicos de pré-condicionamento estão sob investigação tais como o nicorandil, a adenosina e estatinas. A adenosina é conhecida por desempenhar um papel no pré-condicionamento e no pós-condicionamento [Laubach *et al.*, 2011]. Existem outras estratégias farmacológicas que têm demonstrado pouco ou nenhum sucesso nos ensaios clínicos incluindo antioxidantes (ex.: alopurinol), fármacos anti-inflamatórios, (ex.: metilprednisolona) e vasodilatadores (ex.: prostaglandinas e dopamina) [Laubach *et al.*, 2011]. Contudo, muitos agentes antioxidantes que apresentam diferentes mecanismos de ação, continuam a ser experimentados na proteção do fígado na lesão de isquemia/reperfusão, em estudo experimentais e clínicos [Zhang *et al.*, 2007].

#### 1.3.4.1 Inibidores da geração de ROS

Os mitocôndrios são o principal local de formação de ROS na célula. Esta ocorre nos complexos I e III da cadeia mitocondrial de transporte de elétrões, existindo alguns

fatores como inibidores da cadeia respiratória ou da permeabilidade mitocondrial que regulam a função da cadeia, afetando a produção de ROS [Zhang et al., 2007].

O xantina oxidase (XO), um oxidase gerador de ROS, parece estar envolvido na modulação da atividade do NF- $\kappa$ B pelas ROS após uma situação de hipoxia/reoxigenação. Sabe-se ainda que em situações de hipoxia, a supressão da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e a bioatividade do TNF- $\alpha$  podem ser revertidas se os fígados forem pré-tratados com o inibidor da XO, alopurinol [Loftis et al., 2000]. Rac1, um membro da família Rho dos GTPases pequenos, desempenha um importante papel na produção de ROS e na ativação *in vitro* do NF- $\kappa$ B. A inibição da Rac1 através de um adenovírus codificando um mutante negativo dominante de Rac1 (Ad5N17Rac1) atenua o *stress* oxidativo intracelular durante a fase inicial da reperfusão, protegendo contra a lesão hepática [Ozaki et al., 2000] e [Harada et al., 2003]. Estes resultados indicam que o Rho-cinase pode ser visto como um novo alvo terapêutico na I/R. Também os antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol, ebselen, ou idebenone (um análogo do ubiquinol), reduzem a formação de ROS, prevenindo a subsequente abertura do poro mitocondrial de permeabilidade transitória (MPT), e a liberação do citocromo c dos mitocôndrios dos hepatócitos, resultando numa redução da lesão do fígado [Zhang et al., 2007].

#### **1.3.4.2 Antioxidantes membranares e extracelulares**

Como referido, o  $\alpha$ -tocoferol é o inibidor mais importante das reações em cadeia da peroxidação lipídica, provocadas por radicais livres. Atua como um captador de radicais peróxido, e apresenta outras propriedades não antioxidantes, como a inibição da proteína cinase C. É observada uma redução significativa dos níveis de  $\alpha$ -tocoferol no fígado durante a primeira hora de reperfusão num modelo animal de rato com isquemia hepática [Glantzounis et al., 2005], o qual apresenta também efeitos benéficos na lesão de I/R a frio [Glantzounis et al., 2005].

O ácido ascórbico em pequenas doses (< 100 mg/Kg) apresenta também um efeito protetor na função hepática num estudo experimental de lesão de I/R hepática. Contudo, elevadas doses de ácido ascórbico agravam esta lesão devido ao aumento da redução dos iões férricos à sua forma  $\text{Fe}^{2+}$  [Glantzounis et al., 2005].

A melatonina é uma hormona produzida pela glândula pineal que ajuda na regulação do ritmo circadiano e exibe atividade antioxidante. Num estudo experimental com ratos sujeitos a isquemia hepática durante 60 minutos e após duas horas de reperfusão, a administração de melatonina preserva o estado energético e funcional do órgão, reduz



a produção de TNF- $\alpha$  e inibe a expressão de iNOS [Rodriguez-Reynoso et al., 2001]. Um estudo clínico recente em doentes com resseções hepáticas sugere que o efeito protetor da melatonina pode dar-se através do aumento da apoptose de neutrófilos [Glantzounis et al., 2005].

A administração de ácido lipóico em modelos experimentais de I/R a frio e a quente demonstra efeitos protetores através do reforço da via fosfatidilinositol-cinase [Glantzounis et al., 2005].

O pré-tratamento com ubiquinol previne a diminuição dos níveis hepáticos, pós-isquémia, de  $\alpha$ -tocoferol e glutathione, atenuando também a peroxidação lipídica e a diminuição da respiração mitocondrial em ratos submetidos a isquémia hepática parcial. A administração oral de idebenona, um análogo do ubiquinol, em fígados de porco isolados e perfundidos, reduz significativamente a lesão de reperfusão mediada por neutrófilos. A combinação do ubiquinol com a pentoxifilina tem um efeito protetor na lesão de I/R a quente, uma vez que mantém os níveis de GSH e inibe a peroxidação lipídica [Glantzounis et al., 2005].

Os iões de ferro livre no seu estado  $\text{Fe}^{2+}$  catalisam a formação de radicais hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio (reação de Fenton), podendo iniciar-se assim, a peroxidação lipídica. A desferrioxamina é um quelante de ferro usado no tratamento de doenças relacionadas com o ferro, como a talassémia. O pré-tratamento com desferrioxamina *in vivo*, em condições experimentais, protege da isquémia a frio e a quente [Glantzounis et al., 2005].

A leflunomida, um derivado do isoxazole e agente imunomodulatório, ao ser administrado em animais com I/R avançada, alivia significativamente as alterações morfológicas hepáticas e a ativação de neutrófilos, reduzindo os elevados níveis de produtos do *stress* oxidativo e restaurando as enzimas hepáticas antioxidantes. O mecanismo da citoproteção da leflunomida parece dever-se à sua atividade antioxidante, inibindo a libertação de ROS pelos glóbulos brancos [Zhang et al., 2007]. Considera-se que a polienilfosfatidilcolina (PPC) tem efeitos altamente antioxidantes, citoprotetores, e anti-inflamatórios. Observou-se uma diminuição dos níveis de AST e ALT e de hemorragia em grupos pré-tratados com 100 mg/dia de PPC durante sete dias, comparando com grupos não tratados. A PPC ainda inibe a diminuição dos níveis de SOD e GSH após a reperfusão. Este tratamento pode ser terapêutico em transplantes hepáticos e noutras condições associadas a lesões de I/R [Zhang et al., 2007].

Diversos estudos experimentais usando biomoléculas de trimetazidina ou análogos da trimetazidina, têm demonstrado efeitos benéficos após isquémia hepática a quente. Postula-se que o modo de acção seja através da quelatação de iões de metais,



principalmente de íons cobre. Para além disso, também fenóis de plantas e medicamentos fitoterápicos têm demonstrado efeitos benéficos [Glantzounis *et al.*, 2005].

É notável que existem inúmeras evidências experimentais sobre os efeitos protetores de antioxidantes extracelulares na lesão de I/R hepática. Contudo, a maioria destes antioxidantes ainda não foram testados em pequenos ou grandes ensaios clínicos [Glantzounis *et al.*, 2005].

#### **1.3.4.3 Antioxidantes intracelulares**

##### Compostos tiólicos

Os tióis representam um grande grupo de antioxidantes intracelulares que protegem da lesão de I/R. O glutatíon (GSH) é o principal tiol não proteico responsável por manter o estado redox intracelular e protege as células contra os *stresses* oxidativo e nitrosativo. A administração intravenosa de GSH previne o destacamento das células sinusoidais endoteliais (SEC) bem como a perda de microvilosidades e o inchaço dos mitocôndrios dos hepatócitos, diminuindo assim, a lesão de reperfusão em fígados isquémicos de ratos [Leutner, *et al.*, 2005] e [Hassan *et al.*, 2005]. Contudo, à administração de glutatíon exógeno está associado o problema da entrada deste composto nas células uma vez que não existe transportador e o GSH apresenta uma massa molecular elevada. Assim, os precursores do glutatíon podem ser mais eficazes em situações associadas com *stress* oxidativo intracelular grave. A N-acetilcisteína (NAC) atua como um precursor do glutatíon que entra nas células mais facilmente devido ao seu tamanho mais pequeno. A biossíntese do glutatíon é suportada pela desacetilação da NAC para formar cisteína, o aminoácido com concentração limitante para biossíntese do GSH [Cotgreave, 1997]. Fígados com esteatose (“fígados gordos”) são altamente susceptíveis a lesões de I/R, e a administração de NAC melhora significativamente o fluxo portal, a microcirculação hepática, a composição biliar, e o fluxo biliar 5 horas após a reperfusão em coelhos esteatóticos [Fusai *et al.*, 2005]. Tem sido demonstrado mais recentemente que a bucilamina, outro antioxidante tiólico, previne a lesão de reperfusão em modelos animais de transplantação hepática, em rato, tanto em fígados gordos como normais [Amersi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007].

### Ciclooxigenase

O ciclooxigenase (COX) é um enzima chave na cascata que promove a formação de prostaglandina E2 (PGE2) a partir de ácido araquidônico. Apresenta duas isoformas diferentes, o COX-1 e O COX-2, e considera-se que a forma constitutiva COX-1 contribui para manter a homeostase normal dos tecidos [Morham *et al.*, 1995]. Contrariamente, o COX-2, a isoforma indutora de mitose, encontra-se normalmente em células imunes e inflamatórias, resultando numa inflamação específica. O celecoxib, um inibidor seletivo do COX-2, diminui as atividades do ALT, AST,  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) no plasma, e do LDH em fígados com lesão de I/R de ratos, enquanto os valores de SOD, catalase (CAT) e GSH-Px aumentam comparativamente com o grupo não tratado [Ozturk *et al.*, 2006].

### Heme-Oxygenase 1

O grupo heme livre causa efeitos tóxicos em tecidos e órgãos através da geração de ROS degradando lípidos, proteínas e DNA. Até à data foram identificadas três isoformas de HO: HO-1, HO-2 e HO-3. A indução de HO-1 com protoporfirina de cobalto (Co-PP), um agonista de HO-1, protege contra a morte celular por isquemia mediada por neutrófilos, fato que é indicado pela atenuação da libertação de ALT e morte celular por apoptose mediada pelo TNF- $\alpha$ . A bilirrubina, um produto da HO-1, é considerada como um potencial antioxidante de grande significância fisiológica, a qual melhora o fluxo sanguíneo da veia porta, aumenta a produção de biliar, e diminui os danos hepatocelulares observados num modelo *ex vivo* de I/R hepática, o qual foi administrado com bilirrubina [Zhang *et al.*, 2007]. Num tratamento a curto prazo com níveis micromolares de bilirrubina, observou-se uma atenuação da disfunção biliar e da lesão celular de enxertos tanto *in vivo* como *ex vivo* mesmo sem pré-condicionamento com HO-1, demonstrando o papel importante da bilirrubina como antioxidante [Zhang *et al.*, 2007].

### Superóxido dismutase

O conceito inicial por detrás do uso de SOD era acelerar a desintoxicação do radical superóxido, prevenindo a geração do radical HO $\cdot$  que é extremamente reativo. Contudo, esta visão terapêutica tem vindo a mudar nos últimos anos. Assim pensa-se atualmente que o efeito terapêutico do SOD está relacionado com o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Armogiga *et al.*, 2012]. Estudos experimentais de I/R hepática

*in vivo* relatam efeitos protetores do pré-tratamento com SOD. Contudo, outros estudos não conseguiram demonstrar o efeito protetor da administração deste enzima [Glantzounis *et al.*, 2005].

De modo a desintoxicar eficazmente as ROS intracelulares, ou a SOD tem de entrar nas células, ou o superóxido tem de deixar as células para ser metabolizado extracelularmente. Quanto ao fígado, não existem evidências de que o radical superóxido se consiga mover através de membranas [Glantzounis *et al.*, 2005]. Os principais problemas com a administração de SOD são o seu curto tempo de meia vida na circulação (cerca de 6 min), e a falta de internalização da proteína intacta para o interior das células. A entrega para locais alvos inadequados pode ser uma das causas para os vários resultados relatados na literatura [Glantzounis *et al.*, 2005]. Assim, de forma a melhorar a disponibilidade de SOD intracelular, têm-se desenvolvido novos derivados que incluem, por exemplo, a conjugação da SOD com glícidos que facilitam a internalização para as células não parenquimatosas do fígado. As técnicas desenvolvidas até então são a manosiilação, succinilação e peguilação. As células de Kupffer e as células do endotélio sinusoidal apresentam recetores que reconhecem e internalizam ligandos contendo manose, e proteínas succiniladas e peguiladas, sendo por isso que os derivados de SOD direcionados demonstram efeitos benéficos na prevenção da lesão de I/R hepática a quente [Glantzounis *et al.*, 2005].

### Catalase

Os dados na literatura são ambivalentes sobre o papel do catalase na lesão de I/R do fígado [Nodstrom *et al.*, 1988] e [Tanaka *et al.*, 1990]. Os principais problemas são os mesmos relacionados com o SOD: curto tempo de semi-vida no plasma e dificuldade de internalização nas células. De forma a contornar estas limitações, foram desenvolvidos derivados da catalase a partir da conjugação com glícidos. Assim, os resultados iniciais parecem promissores, e a administração conjugada de SOD e de catalase foi experimentada, tendo sido bons os resultados obtidos [Yabe *et al.*, 2001]. De entre as diferentes combinações, a combinação do Man-SOD com Suc-catalase foi a que apresentou maior eficácia na prevenção da lesão hepática. Esta combinação reduz significativamente a expressão da ICAM-1- e a infiltração de neutrófilos [Glantzounis *et al.*, 2005].

Alopurinol

O alopurinol é um inibidor do XO. Baixas doses (5-10 mg/Kg) são suficientes para inibir a atividade hepática do xantina oxidase e do xantina desidrogenase quase por completo. Contudo, estas doses não são totalmente protetoras para lesão da I/R no fígado. Por outro lado, um estudo experimental em ratos, onde o alopurinol foi administrado intra-peritonealmente, antes da isquemia e em doses elevadas (50 mg/Kg), demonstrou um claro papel protetor da lesão de I/R hepática. Existem evidências experimentais de que o alopurinol tem um papel protetor na toxicidade induzida por paracetamol. O mecanismo mais provável para este efeito protetor é a prevenção do *stress* oxidativo mitocondrial. Um mecanismo alternativo, é a sua ação como captador de radicais, e muito provavelmente de peroxinitrito [Glantzounis *et al.*, 2005].

**1.3.4.4 Antioxidantes que modulam o metabolismo do  $\cdot\text{NO}$** 

O  $\cdot\text{NO}$  tanto apresenta efeitos benéficos como prejudiciais na lesão de isquemia/reperfusão hepática. Evidências recentes mostram que durante o período de reperfusão os NOS são regulados quer pelos hepatócitos quer pelas células inflamatórias durante a fase tardia da reperfusão. A expressão da iNOS está associada com a formação de  $\text{ONOO}^-$  apesar do papel do peroxinitrito na I/R hepática não estar bem claro. Tem sido postulado que quando a quantidade endógena de SOD e GSH não é suficiente para inibir a formação de  $\text{ONOO}^-$ , ocorrem normalmente danos celulares. Assim, a intervenção farmacológica para bloquear a formação de  $\text{ONOO}^-$  poderá ter um papel protetor contra os efeitos tóxicos da produção massiva de  $\text{ONOO}^-$ . Esta intervenção, poderá então atuar quer ao nível dos reagentes ( $\cdot\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ou do produto ( $\text{ONOO}^-$ ). O bloqueio do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pode ser feito através do uso de SOD e dos seus derivados. Existem relatos na literatura que mostram efeitos benéficos no uso de inibidores seletivos de iNOS em lesões de I/R hepática a frio e a quente [Glantzounis *et al.*, 2005].

Conhecem-se estratégias que visam diminuir o tempo de vida intrínseco do  $\text{ONOO}^-$  [Glantzounis *et al.*, 2005] que assentam no desenvolvimento de decompositores de  $\text{ONOO}^-$  que têm por base complexos de porfirina de ferro. Contudo, a pesquisa por outros complexos redox ativos que assistam a isomerização do peroxinitrito a nitrato continua [Glantzounis *et al.*, 2005].

#### 1.3.4.5 Pré-condicionamento isquêmico

O pré-condicionamento isquêmico (IPC), que é definido como breves períodos de I/R antes da isquemia sustentada, tem sido relatado para conferir um estado de proteção de alguns órgãos, resultando num aumento da tolerância relativamente a situações de hipoxia. Existem vários mecanismos que explicam a proteção do IPC na I/R hepática. Quando um fígado de rato fica sujeito a 90 minutos de isquemia, seguido de cinco horas de reperfusão, a atividade dos aminotransferases aumenta no soro e a peroxidação lipídica nos mitocôndrios aumenta. Verifica-se ainda que mitocôndrios isolados de fígado de rato após cinco horas de reperfusão incham rapidamente, fato que se atenua ao submeter o órgão a IPC antes da isquemia sustentada. Esta proteção está associada com baixos níveis de *stress* oxidativo. Para além disto, o pré-condicionamento inibe a IL-1 através do  $\text{NO}$  e induz a proteína de choque térmico-70 (HSP70) e o HO-1 através de formas independentes de  $\text{NO}$ , em transplantes hepáticos ortotópicos de tamanho reduzido (ROLT) [Franco-Gou *et al.*, 2006]. Além disso, biomarcadores do *stress* oxidativo em geral (glutathione oxidado (GSSG) e malondialdeído (MDA)) e do *stress* oxidativo gerado por neutrófilos (epítomos de hipoclorito modificado (HOCl)) foram suprimidos em fígados com pré-condicionamento isquêmico bem como a extravasão de neutrófilos [Hasegawa *et al.*, 2005].

#### 1.3.4.6 Terapia génica antioxidante

A terapia génica tem sido recentemente aplicada como uma estratégia terapêutica contra a lesão de I/R. São utilizados duas categorias de sistemas de vetores: virais e não virais. As vantagens de sistemas baseados em vírus incluem a elevada eficiência de infeção e a capacidade de codificar múltiplos genes. Do lado das desvantagens encontram-se a imunogenicidade e questões de produção do vetor. Por estas razões, têm sido desenvolvidos sistemas de vetores não virais como lisossomas e complexos de DNA-proteína [Glantzounis *et al.*, 2005].

Na lesão de I/R hepática, têm sido usados predominantemente vetores virais, tipicamente vírus recombinantes. Elevadas doses de SOD mitocondrial têm sido administradas em ratos, através de vetores virais, impedindo o desenvolvimento da lesão de I/R hepática, através da inativação do NF- $\kappa$ B e da proteína ativadora-1. Estudos experimentais em rato com transplante de fígado normal e esteotático, têm demonstrado que o SOD citosólica e mitocondrial aumenta de forma acentuada a sobrevivência, enquanto que o SOD extracelular não apresenta efeito protetor [Lehmann *et al.*, 2000] e [Lehmann *et al.*, 2003]. Num outro estudo experimental

[Wheeler *et al.*, 2001], demonstrou-se que a sobre-expressão das três isoformas de SOD protegeu contra o aumento dos transaminases no soro e contra a necrose hepatocelular que se observa após a I/R, sendo que estas três isoformas ainda protegem os lípidos da peroxidação. De notar que, a isoforma extracelular apresenta proteção quando administrada em doses muito elevadas [Glantzounis *et al.*, 2005].

A terapia génica é vista como um potencial para melhorar as consequências da lesão de I/R no fígado. Embora o seu valor esteja limitado em situações de transplante de fígado de cadáveres, pela natureza de emergência do procedimento, esta pode ser aplicada em cirurgias de fígados em casos de tumores ou transplantes de dadores vivos. No entanto, o sucesso futuro das terapias génicas requer um melhor entendimento da fisiopatologia da I/R. Embora as ROS possam causar lesões celulares durante a I/R, estas espécies também têm um papel no crescimento e proliferação das células normais. Desta forma, os alvos das terapias devem ser as ROS responsáveis pelas lesões celulares e para além disso, devem ser identificados os compartimentos celulares que produzem as ROS prejudiciais. Um vetor recombinante adenoviral tem sido usado para inibir a ativação do NF- $\kappa$ B num modelo de hepatectomia parcial, resultando numa apoptose massiva e num atraso da regeneração do processo [Iimuro *et al.*, 1998]. Este estudo demonstrou que o NF- $\kappa$ B é importante na prevenção da apoptose e também na regeneração das células do fígado [Glantzounis *et al.*, 2005].

### 1.4 Biomarcadores hepáticos

A I/R hepática, considerada a maior causa de danos hepáticos associados a múltiplos traumas, choque hemorrágico e séptico, e transplante de fígado, contribui significativamente para a insuficiência de muitos órgãos. O desenvolvimento de novos e sensíveis biomarcadores que detetem estágios iniciais da lesão hepática é vital para um manuseamento eficaz e para o tratamento da lesão isquémica no fígado [Svetlov *et al.*, 2006].

A I/R resulta na morte celular hepática via apoptose e necrose, acompanhada pela libertação de enzimas citosólicas tais como a alanina aminotransferases (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) para o meio extracelular [Svetlov *et al.*, 2006]. Avanços na cirurgia hepática e nos transplantes de fígado têm conduzido a um aumento no número destas intervenções, contudo, a avaliação quantitativa da função hepática e da subsequente morbilidade e mortalidade após a cirurgia continua a ser difícil, apesar dos biomarcadores históricos utilizados atualmente, a nível do parênquima hepático [Liu *et al.*, 1996]. O fígado é um dos órgãos mais sensíveis à

isquemia, sendo que avanços nas cirurgias e transplantes hepáticos têm estimulado, em particular, a procura de marcadores bioquímicos quantitativos que proporcionem, a cirurgiões e clínicos, um meio de avaliar objetiva e expeditamente a integridade funcional deste órgão após várias cirurgias, em particular aquelas que requerem isolamento do órgão do seu fornecimento de sangue normal por períodos de tempo significativos [Liu *et al.*, 1996].

Os enzimas geralmente são usados para monitorizar a função hepática pós-cirurgia, incluem o alanina aminotransferases (ALT), o aspartato aminotransferase (AST), o gama-glutamilttransferase (GGT), o fosfatase alcalina (ALP) e o lactato desidrogenase (LDH).

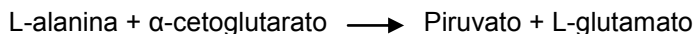
#### **1.4.1 Aminotransferases**

As lesões hepatocelulares induzidas pela I/R estão associadas a uma diminuição na função do fígado, demonstrada pela correlação significativa entre o comprometimento do fluxo biliar e o aumento da atividade sérica do AST e do ALT [Vollmar *et al.* 1994]. Os aminotransferases são um grupo de enzimas que catalisam a transferência reversível do grupo amina de um  $\alpha$ -aminoácido para um oxo ácido [Amacher, 1998]. O ALT citosólico está associado com a utilização do piruvato na glicólise, enquanto que o ALT mitocondrial está envolvido na conversão da alanina a piruvato na gluconeogénese. O AST apresenta um papel importante no transporte de equivalentes redutores pela membrana mitocondrial. Danos hepatocelulares com subsequente rompimento da membrana plasmática, permitem a fuga de enzimas intracelulares como o ALT e AST, para o fluxo sanguíneo. Também na presença de hepatotóxicos, a síntese de aminotransferases aumenta no fígado [Amacher, 1998]. Tendo em conta o tempo de semi-vida de aproximadamente 17 h para o AST e 47 h para o ALT, a presença destes enzimas no soro é considerada um indicador de lesão nos hepatócitos [Amacher, 1998].

##### **1.4.1.1 Alanina aminotransferase**

Dos vários biomarcadores de laboratório para a lesão no fígado, os transaminases do soro, especialmente o alanina aminotransferase (ALT), são os indicadores universais mais importantes para estudos que vão desde testes clínicos precoces até à monitorização de valores em doentes hepáticos [Amacher, 1998]. O ALT (L-alanina:2-

oxoglutarato aminotransferase, EC 2.6.1.2) tem como coenzima o fosfato de piridoxal, e catalisa a seguinte reação reversível (Equação 7):



**Equação 7**

A presença de baixos níveis de ALT na circulação periférica está relacionada com a renovação celular ou com a libertação por fontes não vasculares. Aumentos na atividade dos aminotransferases relacionados com a administração de fármacos são tipicamente transitórios, com os valores a voltar ao valor normal de referência após poucas semanas após a administração [Amacher, 1998]. O ALT está amplamente distribuída pelo que as isoenzimas humanas se encontram no citosol e no mitocôndrio do fígado, rins, músculo-esquelético e cardíaco. O ALT mitocondrial apresenta atividade tecidual, e não aparece no soro humano em condições normais. A maior quantidade de ALT encontra-se no citosol das células do parênquima hepático. Têm sido encontradas diferenças consideráveis tanto na distribuição nos órgãos como na compartimentação celular do ALT entre diferentes espécies. Contudo, o ALT presente no soro é um dos marcadores universais para lesões hepáticas em várias espécies [Amacher, 1998].

Em laboratórios clínicos, a medição do ALT faz parte da rotina bioquímica sérica usada para avaliar a lesão hepática. Contudo, o valor do ALT no sangue normal pode ser influenciado pela idade, sexo, alterações na dieta, localização geográfica, etnia, obesidade, álcool, entre outros fatores [Amacher, 1998]. A atividade do ALT apresenta-se elevada dias após cirurgias abdominais e torácicas e também após tratamento de algumas doenças. De notar que o ALT é o indicador mais importante em lesões hepatocelulares de estudos animais pré-clínicos, ensaios clínicos e ainda em monitorização de certas doenças [Amacher, 1998].

### **1.4.1.2 Aspartato aminotransferase**

O aspartato aminotransferase (AST) é encontrado tanto no citosol como nos mitocôndrios dos hepatócitos, mas os níveis mais elevados são encontrados no coração, músculo-esquelético, rins, cérebro e pâncreas. Desta forma, traumas musculares e cirurgias conduzem por si só a um aumento dos níveis de AST no soro. Estima-se que 60 a 70% da atividade do AST nos hepatócitos humanos provem do AST mitocondrial. Assim, quando encontrada no sangue, o AST é considerada um indicador sensível de lesões mitocondriais, especialmente em regiões hepáticas centri-



lobulares que são particularmente sensíveis à lesão hepática por hipoxia ou por toxicidade [Amacher, 1998]. Desta forma, o AST conjugada com o ALT são marcadores importantíssimos da lesão hepática [Amacher, 1998].

#### **1.4.2 $\gamma$ -Glutamyltransferase**

O  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) é um enzima sensível a distúrbios hepatobiliares e que tem sido extensivamente estudada na hepatocarcinogénese, sendo que a sua medição é usada como teste de rotina em laboratórios. É geralmente aceite como um marcador muito sensível da colestase [Jian *et al*, 2007]. É um ectoenzima heterodimérica, de natureza glicoproteica e ligada à membrana celular. O GGT catalisa a degradação do glutatióno, e de outros compostos  $\gamma$ -glutamilo [Jian *et al*, 2007].

No fígado de rato, a elevada atividade da GGT observada no estágio fetal, diminui rapidamente à nascença, sendo escassamente detetável em adultos. Estudos experimentais demonstram que a GGT é notavelmente ativada durante modelos animais de hepatoma e que aumenta significativamente em hepatócitos nos estádios pré-cancerígenos e no hepatoma hepatocelular. Esta enzima é sobre expressa durante a hepatocarcinogénese no fígado adulto, e é por isso que é vista como um marcador inicial da diferenciação celular, sinalizando a reversão dos hepatócitos a fenótipos fetais. Contudo, a atividade total da GGT no soro permite fazer diferentes diagnósticos acerca de lesões benignas ou malignas do fígado [Jian *et al*, 2007].

Em situações normais, a GGT é secretada principalmente pelas células de Kupffer e pelas células endoteliais do ducto biliar. Existem 13 isoformas da GGT, sendo algumas delas apenas detetadas em doentes com carcinomas hepatocelulares [Zhou *et al*, 2006].

#### **1.4.3 Fosfatase alcalina**

O fosfatase alcalino (ALP) está presente no soro humano e é composta por diversas isoformas originárias de vários tecidos: osso, fígado, intestino, rins e placenta. As isoformas do fígado e osso representam a maioria do ALT que circula no soro e são ambas produto do mesmo *loci* genético, diferindo apenas na glicosilação pós-transducional. Assim, é difícil distinguir diferenças entre estas duas isoformas mas é necessário fazê-lo para uma utilização clínica confiável [Gomez *et al*, 1995]. A concentração do ALP é usada como biomarcador de doenças relacionadas com os

órgãos de onde as diversas isoformas são provenientes [Wang *et al.* 2009]. É em doentes com distúrbios hepatobiliares, como hepatite, cirrose e carcinoma do fígado que se verifica um aumento nas concentrações da isoforma hepática [Gomez *et al.*, 1995].

### 1.5 Lipossomas

A primeira descrição do comportamento coloidal de fosfolípidos como a lecitina, entre outros, bem como da formação de vesículas lipídicas ocorreu em 1961 por Bangham e seus colaboradores. Foi neste estudo [Bangham & Horne, 1964] que se descreveu a formação destas vesículas fosfolipídicas em soluções aquosas diluídas e que se considerou que “os lipossomas são as menores vesículas artificiais de forma esférica que podem ser produzidas a partir de fosfolípidos naturais não tóxicos e de colesterol. Os lipossomas são microscópicos, bolsas cheias de líquido cujas paredes são feitas de camadas de fosfolípidos idênticos aos fosfolípidos que compõem as membranas celulares”. Assim, atualmente os lipossomas são descritos como vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um espaço interno aquoso. Os lipossomas podem incorporar vários tipos de substâncias independentemente do seu peso molecular, da sua solubilidade ou carga elétrica, sendo que substâncias hidrófilas ficam no espaço interno aquoso e as de natureza hidrófoba inseridas na bicamada lipídica [Cruz *et al.*, 2009]. Estas vesículas são constituídas essencialmente por fosfolípidos (de natureza natural ou sintética), esteróis, antioxidantes e outras substâncias anfipáticas capazes de se inserirem na membrana. Os lípidos mais utilizados nas formulações lipossomais são os que apresentam uma forma estrutural cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidilgliceróis e a esfingomielina, pois tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa [Batista *et al.*, 2007]. Quanto às suas aplicações, estas são muito variadas podendo ser usados como modelos membranares, como sistemas para terapia e diagnóstico ou ainda para aplicações analíticas [Batista *et al.*, 2007].

A temperatura de transição de fase ( $T_c$ ) é uma característica dos fosfolípidos em que estes podem passar de uma fase ordenada, onde as cadeias se encontram mais compactadas, a qual é denominada fase gel, para um outro estado denominado fase cristal-líquido, em que existe uma maior desordem e onde os movimentos das cadeias acilo se encontram mais livres. Os fatores que influenciam o valor da temperatura à qual se dá esta transição são: comprimento, saturação (existência ou não de duplas ligações) e ramificações da cadeia. Daqui se depreende que fosfolípidos diferentes

tenham T<sub>c</sub> diferentes. A permeabilidade dos lipossomas torna-se baixa quando a temperatura em que estão as vesículas é menor que a T<sub>c</sub> dos fosfolípidos que constituem a membrana, sendo que esta permeabilidade é medida pelo fluxo ou pela taxa em que o soluto sai do compartimento aquoso, através da bicamada. Esta propriedade vai por isso depender, da natureza do soluto [Batista *et al*, 2007].

A estabilidade dos lipossomas, muito importante para estudos como modelos membranares e como transportadores de fármacos, pode ser afetada por processos químicos, físicos e biológicos. Dependendo da sua composição, as formulações dos lipossomas podem apresentar um curto tempo de meia-vida, devido à instabilidade física e química. Por isso, a estabilidade deverá manter-se durante todo o armazenamento da formulação lipossomal [Batista *et al*, 2007].

A instabilidade química é dependente da composição dos lipossomas a qual deve impedir a hidrólise de ésteres e a oxidação das ligações saturadas presentes nas cadeias lipídicas. Quando ocorre a indesejada hidrólise, há formação de um produto intermediário, como por exemplo a liso-fosfatidilcolina (liso-PC), que aumenta a permeabilidade dos lipossomas e prejudica a integridade da formulação. O pH é um dos fatores que favorece a hidrólise dos lípidos, o qual se deve manter na ordem dos 6,0. Estes problemas podem ser ultrapassados conservando os lipossomas em atmosfera de azoto ou árgon, usando antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol na sua preparação, ou liofilizando a formulação final usando um crioprotetor, uma vez que este processo aumenta a meia-vida da formulação lipossomal, devido à maior estabilidade em estado seco [Batista *et al*, 2007].

A estabilidade dos lipossomas é também afetada por parâmetros físicos, tais como a agregação, a fusão de vesículas e a libertação indesejada do fármaco encapsulado. Assim, existem formas de diminuir a agregação e a fusão de vesículas, como incluir uma pequena quantidade de lípidos com carga na preparação da formulação, o que produz repulsões eletrostáticas. A carga superficial dos lipossomas pode também ser manipulada pela introdução na bicamada lipídica de lípidos neutros, carregados positiva ou negativamente. Em geral, a presença de uma carga electroestática na superfície dos lipossomas promove a interação com as proteínas do plasma (as opsoninas) e outras biomoléculas, sendo mais rapidamente eliminados do que os lipossomas neutros [Batista *et al*, 2007]. Um dos maiores pré-requisitos para o uso de lipossomas como agentes terapêuticos, é circular e reterem o fármaco por tempo suficiente até atingirem e interagirem com o alvo. O tempo de meia vida dos lipossomas, em meio biológico, pode ser aumentado pela hidrofília conferida à superfície dos lipossomas uma vez que a incorporação de componentes hidrófilos

evita o reconhecimento e a captura destes pelo sistema fagocitário mononuclear (MPS). Este sistema, ativado em processos inflamatórios, é composto por macrófagos e monócitos que removem corpos estranhos da circulação sanguínea e fornecem células fagocitárias, recrutando citocinas e proteínas do sistema complemento. A incorporação de biomoléculas de reconhecimento nos lipossomas confere um maior direcionamento para o alvo. No entanto, estes lipossomas com superfície modificada terão que apresentar um tempo de circulação suficiente para que possam chegar ao alvo fora do MPS. A permeabilidade, e a consequente libertação indesejada do fármaco encapsulado, poderá ser diminuída pela incorporação de colesterol e de esfingomiélin na formulação, aumentando também a temperatura de transição de fase de lípidos fluidos, e a estabilidade física em geral. O colesterol ao diminuir fluidez e a deformação da membrana insaturadas, pode ser considerado um dos componentes importantes para integridade da membrana das vesículas e pode igualmente prolongar o tempo de circulação *in vivo*. Após administração, vesículas com grande proporção de colesterol e de pequeno tamanho tendem a concentrar-se no baço e na medula óssea, enquanto que lipossomas pobres ou sem colesterol podem localizar-se predominantemente no fígado (igualmente dependendo do seu tamanho) [Batista *et al.*, 2007].

### 1.5.1 Classificação de lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados consoante as suas propriedades físico-químicas (composição lipídica, número de bicamadas, tamanho e carga), os seus métodos de preparação ou ainda pelo seu comportamento *in vivo*. A diversidade de partículas que podem ser obtidas resulta de uma conjugação fatorial das características referidas. Quanto ao tamanho dos lipossomas, este pode variar de cerca de 40 nanómetros a vários micrómetros. Esta característica conjuntamente com a composição lipídica é crucial na determinação do seu comportamento *in vivo*. Considera-se que a estabilidade e o tempo de circulação dos lipossomas obtidos só com fosfolípidos sem a sua superfície modificada – convencionais - aumentam, geralmente, com a redução do tamanho. No entanto, este tipo de lipossomas são dirigidos preferencialmente para o MPS, principalmente o fígado e o baço [Cruz *et al.*, 2009]. Assim, de forma a obter vesículas com características de longo tempo de circulação é necessário incluir certos lípidos e polímeros específicos na sua composição. Lipossomas de longo tempo de circulação (não convencionais) e de pequeno tamanho apresentam um papel importante na entrega de fármacos a certos

tecidos fora do MPS, nomeadamente em locais de infeção, inflamação e tumores sólidos.

Quanto ao número de bicamadas, os lipossomas podem apresentar uma única bicamada lipídica ou múltiplas bicamadas em torno dos compartimentos aquosos internos, sendo classificados em unilamelares e multilamelares, respetivamente. Quanto ao tamanho, todas as vesículas (unilamelares e multilamelares) podem ser pequenas ou grandes. No entanto, no caso dos unilamelares, são designados de lipossomas unilamelares pequenos (SUV - *small unilamellar vesicles*) e lipossomas unilamelares grandes (LUV-*large unilamellar vesicles*) respetivamente [Batista *et al*, 2007]. Enquanto que as SUV apresentam um diâmetro que pode variar entre 40 e 100 nm, as LUV variam entre 200 nm e 10 µm [Segota & Težak, 2006].

Os lipossomas como transportadores de fármacos sofreram algumas alterações desde o início da sua utilização, tentando-se melhorar a estrutura básica para aumentar as suas aplicações terapêuticas. Apesar de não haver uma uniformidade na sua classificação, como já vimos, uma das formas mais usuais de classificar os lipossomas baseia-se na sua interação com sistemas biológicos:

Lipossomas convencionais- Compostos essencialmente por fosfolípidos simples, de origem natural ou sintética, e colesterol. Podem incorporar substâncias hidrófobas com carga positiva ou negativa de modo a evitar a agregação das vesículas e aumentar a estabilidade em suspensão. *In vivo*, estes lipossomas são reconhecidos pelo MPS que os remove rapidamente da circulação [Batista *et al*, 2007].

Lipossomas de longo tempo de circulação- Existem diferentes métodos que permitem obter lipossomas de longo tempo de circulação *in vivo*, de entre os quais se destacam o revestimento da superfície lipossomal com componentes hidrofílicos naturais (como o monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol) ou com polímeros hidrófilos sintéticos, especificamente o polietilenoglicol (PEG) de vários pesos moleculares. A camada hidrófila superficial destes polímeros aumenta o tempo de circulação dos lipossomas prevenindo a associação com as opsoninas do plasma e o consequente reconhecimento pelo sistema imunitário. Desta forma, inibe-se o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do MPS, nomeadamente as células de Kupffer no fígado e no baço [Batista *et al*, 2007].

Os lipossomas de longo tempo de circulação podem ser passivamente direcionados para vários tipos de tumores, uma vez que têm a capacidade de circular por tempo prolongado e extravasar para os tecidos com permeabilidade vascular elevada.

Tumores sólidos crescentes, assim como regiões de infecção e inflamação, apresentam capilares com permeabilidade aumentada como resultado da angiogénese, em que o diâmetro dos poros desses capilares pode variar entre 100-150 nm e em alguns casos específicos de alguns tumores sólidos de cerca de 800 nm (direcionamento passivo). Os lipossomas contendo o fármaco podem apresentar diâmetros que variam de 60 a 150 nm, aproximadamente, tamanho suficiente para conseguirem passar do sangue para o espaço intersticial do tumor e de outros locais com patologias em que há aumento da permeabilidade das linhas endoteliais, passando através de poros [Batista *et al*, 2007].

Lipossomas direcionados- Na tentativa de aumentar a especificidade de interação dos lipossomas com as células alvo, e aumentar a quantidade do fármaco libertado nestas células, a investigação neste campo tem-se focado no desenvolvimento de lipossomas direcionados ou lipossomas sítio-específicos (direcionamento ativo). Para tal, utilizam-se ligantes acoplados na sua superfície, que conferem seletividade no modo de distribuição do fármaco encapsulado no local de ação desejado. A superfície dos lipossomas pode ser modificada escolhendo lípidos que se conjuguem com uma variedade de elementos de reconhecimento. Derivados lipídicos reativos incluem aqueles com um grupo amino, como a fosfatidiletanolamina (PE), e um grupo hidroxilo, usando colesterol ou polietilenoglicol. Os métodos para conjugação de ligantes de reconhecimento são baseados em agentes reticulantes heterobifuncionais, tais como o carboxilato de succinimidil-4 (*N*-maleididometila) (SMCC), butirato de *p*-maleimidofenila (MPB), ou interações não covalentes como as da biotina-estreptavidina. Alguns exemplos de ligantes de reconhecimento são os anticorpos, glicopéptidos, polissacáridos, proteínas virais e lectinas [Batista *et al*, 2007].

### 1.5.2 Lipossomas como nanotransportadores de enzimas

Proteínas e outras macromoléculas biologicamente ativas apresentam geralmente baixa biodisponibilidade e baixos tempos de semi-vida no organismo. As características físico-químicas destas moléculas são responsáveis pela sua deficiente entrega sistémica, requerendo por isso administrações frequentes para manter as concentrações no sangue a níveis terapêuticos. Uma forma de contornar o baixo tempo de permanência plasmática, é promover a associação de proteínas a um sistema de transporte capaz de manter a estrutura e atividade proteica, alterando a sua farmacocinética e entregando-as ao tecido alvo de forma segura, conseguindo

melhorar a eficácia de fármacos proteicos [Cruz *et al.*, 2009]. Para além disso, sabe-se que a estrutura tridimensional das proteínas é facilmente alterada por fatores como ambientes hidrófobos e variações na temperatura e pH. Desta forma, alterações na sua estrutura podem afetar o efeito terapêutico da proteína e desencadear reações imunes adversas [Cruz *et al.*, 2009].

Pelo fato de os lipossomas não necessitarem, durante a sua formação, de condições experimentais muito exigentes quer do ponto de vista químico (ex. solventes orgânicos em todo o processo, pH) quer do ponto de vista físico (altas temperaturas), são um bom sistema de transporte para substâncias lábeis como os enzimas. Atendendo a estas propriedades quase únicas, os lipossomas podem ser obtidos de acordo com o tipo de a substância a encapsular (hidrófilo, hidrófobo ou anfipático), de modo a alcançar o objetivo final da formulação lipossomal (terapia ou diagnóstico). O desenvolvimento/escolha da metodologia da preparação de lipossomas adequados para a incorporação de enzimas têm que preservar a estrutura complexa destas macromoléculas garantindo o não uso de solvente e metodologias agressivas [Cruz *et al.*, 2009].

#### **1.5.2.1 Métodos de preparação de lipossomas para enzimas hidrófilos**

##### **1.5.2.1.1 Enzimas hidrófilos encapsulados no espaço interno aquoso**

Existem vários procedimentos para encapsular enzimas solúveis em soluções aquosas nos lipossomas. O procedimento mais simples consiste na obtenção de Vesículas Multilamelares (MLV). Estas podem ser obtidas através da suspensão de um filme lipídico numa solução aquosa. No entanto, também se podem obter vesículas multilamelares por outros métodos, como exemplo, pelo método da desidratação-rehidratação (DRV), pela evaporação da fase reversa, por diálise de detergente ou por injeção de etanol. Outro tipo de vesículas com menos camadas lipídicas (uni- ou oligolamelares) também poderá ser preparado por processos como a sonicação, extrusão ou homogeneização a alta pressão de uma dispersão multilamelar. Contudo, quando existem enzimas presentes é necessário ter em conta certos aspetos como o uso de solventes orgânicos, o tipo dos fosfolípidos escolhidos, o recurso a ultrassons e produção de calor pois podem resultar na perda de atividade enzimática e consequentemente redução do efeito terapêutico [Cruz *et al.*, 2009]. O método de desidratação-rehidratação (DRV) é o que apresenta maior eficiência de encapsulação e preservação da atividade enzimática, e permite obter vesículas multilamelares entre

0,6 a 2  $\mu\text{m}$ . Neste método, após seco, o filme lipídico é homogeneizado com a solução aquosa que contém o enzima a ser encapsulado, e a suspensão resultante é congelada e liofilizada. O pó resultante da liofilização é então hidratado, com um décimo do volume de partida da dispersão lipossomal, e suavemente agitado, perfazendo-se o volume final após este passo de hidratação. Este método tem sido usado com sucesso na encapsulação do L-Asparaginase, SOD, e formas hidrófobas destes enzimas [Cruz *et al.*, 2009], assunto que será abordado posteriormente, no ponto 1.5.2.1.2.

Como referido, o destino *in vivo* dos lipossomas após administração intravenosa está dependente de diversos fatores nomeadamente da composição lipídica, carga superficial, fluidez da bicamada lipídica, e principalmente do tamanho. Como este último fator desempenha um papel determinante no comportamento *in vivo* do lipossoma após administração parenteral, algumas técnicas foram otimizadas de forma a reduzir o tamanho dos lipossomas, de entre as quais se destacam a sonicação, homogeneização a alta pressão e extrusão [Cruz *et al.*, 2009]. O melhor método para reduzir o tamanho dos lipossomas, preservando a atividade enzimática, consegue-se por extrusão (filtrando sob pressão) a suspensão lipossomal através de filtros (membranas) de policarbonato com tamanhos de poros definidos que variam entre 5 a 0,03  $\mu\text{m}$ . Este método produz as melhores vesículas no que diz respeito à homogeneidade de tamanho e é adequado para a preparação de lipossomas a várias escalas desde um a centenas de mililitros. Diferentes enzimas incorporados em lipossomas foram preparados por este procedimento, sem que tivesse ocorrido perda de atividade enzimática [Cruz *et al.*, 2009].

### 1.5.2.1.2 Enzimas hidrófilos incorporados na membrana lipídica (Enzimossomas)

A formulação de enzimas terapêuticos hidrófilos em lipossomas não é restrita à encapsulação ou à retenção de macromoléculas no espaço interno aquoso das vesículas. Os enzimas podem também ser ligados/associados à superfície dos lipossomas formando uma partícula a qual se denomina enzimossoma, que se define como sendo um lipossomas que expressa atividade catalítica na sua forma intacta, ou seja, antes da rutura da vesícula [Cruz *et al.*, 2009]. A associação de enzimas à membrana exterior dos lipossomas pode ser feita através de duas abordagens: A) ligar o enzima com âncoras hidrofóbas funcionais, tais como longas cadeias de ácidos gordos, ou B) ligando o enzima diretamente a alguns fosfolípidos ou outros



componentes da bicamada do lipossoma. Na primeira abordagem (A), o enzima previamente modificado por conjugação a substâncias hidrófobas pode ser incorporado na membrana do lipossoma durante a formação deste, e consequentemente poderá ficar tanto exposto para a superfície externa como interna do lipossoma; ou poderá ser incorporado após a formação das vesículas e por isso ficará exposto à superfície do mesmo. Nesta abordagem, a incorporação do enzima na bicamada é por interações hidrófobas. Na segunda abordagem (B), o enzima é associado a lipossomas pré-formados por ligação covalente a elementos âncora que se encontram à superfície dos lipossomas. Neste caso, o enzima irá localizar-se somente na superfície externa do lipossoma. Em ambos os casos, devido à complexidade e diversidade estrutural dos enzimas, cada processo tem de ser otimizado de forma a preservar a função do enzima e obter uma quantidade de enzima apropriada na bicamada lipossomal. As principais diferenças entre estas duas abordagens são: o número de moléculas de enzima expostas na bicamada exterior do enzimosoma, a estabilidade da conjugação enzima-lipossoma, a acessibilidade ao centro ativo e as características do enzima modificado, como as moléculas ligadas à enzima, nomeadamente longas cadeias de ácidos gordos ou fosfolípidos. A seleção da abordagem a usar tem de ser realizada de acordo com cada caso de alvo terapêutico do enzima mediado por enzimosomas [Cruz *et al.*, 2009].

Nos enzimosomas de SOD utilizados neste trabalho, o enzima terapêutico encontra-se ligado covalentemente à superfície exterior da bicamada do lipossoma (abordagem B). Tendo em consideração a necessidade de minimizar alterações na atividade da SOD, o enzima é previamente tiolado e a forma SOD-AT é conjugada ao grupo maleimido reativo localizado no terminal do polímero Fosfoetanolamina-N-[Maleimido (Polietileno glicol) 2000] (Maleimido-PEG-PE) [Cruz *et al.*, 2009].

### **1.5.3 Aplicação de lipossomas de SOD em patologias de isquémia/reperfusão**

Para prevenir a sobreprodução de ROS na lesão de I/R hepática, vários investigadores têm desenhado tratamentos com alta potencialidade, baseados na remoção das ROS através da administração intravenosa (i.v.) de enzimas antioxidantes, tais como o SOD. Este enzima de 36 kDa apresenta um perfil farmacocinético pouco favorável, uma vez que ao ser administrado i.v., é caracterizado por um curto tempo de vida no plasma (6 a 12 minutos) e uma rápida remoção renal via filtração glomerular [Gaspar *et al.* 2007]. Estratégias usadas para contornar estes problemas descritas na literatura baseiam-se na conjugação do enzima com polímeros naturais ou sintéticos. Esta

conjugação resulta num aumento de tempo de semi-vida [Gaspar *et al.* 2007]. Por exemplo, o SOD pode ser covalentemente conjugado com polietilenoglicol (PEG), dextrano ou albumina. Outra forma de aumentar o tempo de semi-vida do enzima é incorporar o SOD em lipossomas. Estudos farmacocinéticos indicam que a encapsulação deste enzima em lipossomas aumenta o seu tempo de semi-vida no plasma, após administração i.v., cerca de 5 a 10 vezes [Corvo *et al.*, 1999]. Por isto, uma das estratégias atualmente líder baseada em entregar agentes terapêuticos para locais de patologia como locais de infeção e inflamação, e tumores, é a utilização de lipossomas com tempo e vida prolongado. Um dos métodos mais populares é a inclusão de polietilenoglicol (PEG) ligado ao fosfolípido distearoilfosfatidiletilenoamina (DSPE) [Corvo *et al.*, 1999].

A adição de PEG à superfície dos lipossomas, confere a estes uma superfície estabilizada por estericidade hidrofílica, propriedade que contribui para uma menor afinidade dos macrófagos do MPS para com as partículas de lipossoma circulantes, prolongando a sua circulação sanguínea. Numa variedade de modelos experimentais, estes lipossomas peguilados com longo tempo de circulação, localizam-se preferencialmente em locais de infeção e inflamação, pois apresentam pequenos tamanhos (<150 nm). O aspeto crucial por detrás deste fenómeno benéfico é que o tempo de residência prolongado no sangue permite o extravasamento do PEG-lipossoma para locais de permeabilidade vascular elevada. A propriedade única de PEG-lipossomas para se localizar preferencialmente em locais com permeabilidade capilar elevada, pode ser explorada para melhorar ainda mais a aplicação de lipossomas como transportadores de SOD [Corvo *et al.*, 1999].

### 1.5.4 Aplicação de lipossomas em imagiologia

O uso de lipossomas para administração de agentes de imagem tem uma longa história. Os materiais de contraste podem ser covalentemente ou não covalentemente incorporados em diferentes compartimentos destas partículas transportadoras, sendo que estes têm sido utilizados para imagiologia de diagnóstico experimental do fígado, baço, cérebro, sistema cardiovascular, tumores, situações de inflamação e infeção [Torchilin, 2005]. No diagnóstico por imagem pretende-se obter uma intensidade de sinal de uma área de interesse de modo a que se consiga diferenciar certas estruturas e tecidos envolventes, independentemente da modalidade de imagem escolhida. Atualmente, as modalidades de imagem usadas incluem a gama-cintigrafia, a ressonância magnética (MRI, com base na transição entre diferentes níveis de energia dos núcleos atômicos sob ação de um sinal de radiofrequência), tomografia

computorizada e ultra sonografia. A fim de facilitar a acumulação de contraste na zona requerida, várias micropartículas, incluindo lipossomas, têm sido sugeridos como transportadores de agentes de contraste [Torchilin, 2005].

No caso particular da ressonância magnética, o uso de agentes de contraste paramagnéticos, como o  $Gd^{3+}$  (referido como agente de contraste T1) ou nanonúcleos superparamagnéticos de óxido de ferro (agente de contraste T2) é uma prática comum que permite melhorar os limites de deteção e visualização de órgãos ou células alvo. Devido à elevada toxicidade associada ao  $Gd^{3+}$ , o uso de quelantes e a eliminação renal dos agentes de contraste é altamente desejável. Para experiências de marcação de células *in vitro* ou em estudos *in vivo*, a eliminação das partículas é muito baixa, facto que impede a utilização do  $Gd^{3+}$ . Assim, para este tipo de estudos o uso das nanopartículas de *óxido de ferro superparamagnético* (SPIOs) foi mais frequente [Soenen *et al*, 2011]. Como estes nanonúcleos de óxido de ferro são submetidos a um ambiente biológico, a superfície dos núcleos deste metal tem de ser cuidadosamente adaptada de modo a evitar a agregação destes nanonúcleos, tornando-os mais adequados para aplicações biomédicas. Existem na literatura uma variedade de materiais de revestimento, que incluem o dextrano (usadas como padrão para agentes de contraste de RM para lesões hepáticas em ambiente clínico, mas retirado do mercado recentemente), partículas muito pequenas de citrato de ferro, poliestireno, sílica, ouro, ácido dimercapto-succínico, polietilenoglicol (PEG), ou lípidos (magnetolipossomas, MLs) [Soenen *et al*, 2011]. O conceito geral dos MLs baseia-se na estrutura e características específicas de vesículas fosfolipídicas conhecidas. Os lipossomas, tal como referido anteriormente, são os veículos mais frequentemente empregues para entrega de fármacos, graças a propriedades de excelência que estes possuem como: (1) elevada biocompatibilidade, (2) a possibilidade de passarem por uma grande variedade de manipulações de superfície, (3) a capacidade de conjugar propriedades hidrofóbas (na bicamada lipídica) e o hidrofílicas (na cavidade interna aquosa) numa só partícula, (4) a capacidade de incorporar tanto agentes terapêuticos como de imagem, e ainda (5) a possibilidade de se controlar o tamanho do lipossoma, o qual pode variar de cerca de 40 nm a mais de 1  $\mu m$ . Lipossomas com SPIOs incorporados são geralmente designados por magnetolipossomas (MLs). Assim, graças ao revestimento lipídico, os MLs podem ser combinados com PEG, de forma a melhorar o tempo de circulação sanguínea e permitindo o direccionamento ativo para locais específicos, conjugando péptidos específicos ou anticorpos, ou combinar as propriedades magnéticas dos MLs com outras modalidades de imagem, como a imagem ótica ou a tomografia, e ainda incluir vários tipos de fármacos [Soenen *et al*,

2011]. Tipicamente, podem distinguir-se dois tipos de MLs: (1) grandes vesículas uni- ou multilamelares preparadas normalmente por extrusão que contêm as SPIOs solúveis em água na cavidade do espaço interno aquoso do lipossoma. Estas partículas lipossomais têm a capacidade de encapsular moléculas solúveis em água, e permitem precisamente ajustar a quantidade de óxido de ferro nos lipossomas; (2) pequenas vesículas com uma dupla camada lipídica em que os núcleos de óxido de ferro se ligam á superfície do lipossoma [Soenen *et al*, 2011]. A ressonância magnética surgiu como um método poderoso e não invasivo no domínio da imagiologia molecular e celular. A alta resolução e o excelente contraste do tecido em análise são as principais vantagens em relação a outras técnicas de imagiologia *in vivo* [Soenen *et al*, 2011]. A utilização de sondas de imagens, tais como SPIOs ou GD3+, é geralmente necessário para aumentar o contraste da imagem. Até á data, o número de testes de imagem diferentes é enorme, levando a uma vasta gama de ferramentas, cada uma com sua caraterística. Os MLs surgiram como ferramentas altamente versáteis para as nanopartículas de óxido de ferro, que combina uma geração de agentes de contraste T2 muito eficiente com a versatilidade de caraterísticas possíveis na construção dos lipossomas [Soenen *et al*, 2011].



## 2. Objetivos

---



Este estudo teve como principal objetivo estudar o efeito do uso de enzimosomas (lipossomas com superóxido dismutase covalentemente ligada à sua superfície) como agente terapêutico para o tratamento de lesões induzidas por *stress* oxidativo após situações de I/R hepática. Esta lesão é caracterizada por diversos eventos bioquímicos, nomeadamente a produção em excesso de espécies reativas de oxigénio (ROS), que conduzem a uma resposta inflamatória. Assim, de modo a desintoxicar eficazmente as ROS intracelulares, desenvolveu-se este estudo que assenta na administração de SOD incorporada num sistema vetor de transporte

O estudo dividiu-se em três fases. Uma primeira fase teve como objectivo a optimização do processo cirúrgico de isquémia/reperfusão hepática, tendo-se optado por efetuar uma isquémia de 30 min e sacrificar os animais ao fim de 24 h de reperfusão. Uma segunda fase teve como objectivo a preparação e caracterização de enzimosomas de superóxido dismutase a ser usados nos estudos animais. A terceira fase teve como objectivo avaliar a atividade terapêutica dos enzimosomas e sua comparação quer com SOD quer com SOD encapsulada no espaço interno aquoso de lipossomas de longo tempo de circulação. A atividade terapêutica foi avaliada através da determinação de marcadores de inflamação incluindo as atividades plasmáticas de diversos enzimas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e gama-glutamilttransferase), a determinação da inversão leucocitária e análise anátomo-patológica e ainda níveis de ativação de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B $\alpha$ .





### 3. Materiais e Métodos

---



### 3.1 Materiais

A fosfatidilcolina de ovo (Egg-PC) proveio da Lipoid GmbH (Alemanha). A fosfatidiletanolamina peguilhada (peso molecular 2000) (PEG-PE) foi adquirida ao Polar Lipids. Inc (Alabaster, Alabama EUA). O superóxido dismutase (SOD), o colesterol (Chol) e as partículas de óxido de ferro foram adquiridos à Sigma Chemical Co. St. Louis Mo (EUA). O N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA) proveio da Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois EUA) e o Maleimido-PEG-PE foi comprado à Avanti Polar Lipids. Inc (Alabaster, Alabama EUA). O kit de actividade enzimática Bioxytech SOD-525 para a SOD provém da Oxis International, Inc. (Califórnia, EUA). O ácido tricloroacético (TCA) usado na quantificação de proteína pelo método do TCA foi adquirido à Panreac Química S.L.U. (Barcelona, Espanha). O reagente de Folin-Ciocalteu's utilizado na quantificação de proteína quer pelo método do TCA, quer pelo método de Lowry, proveio igualmente da Panreac Química S.L.U. (Barcelona, Espanha). Quanto às anestésias, a Imalgene 1000 foi comprada à Merial Portuguesa Saúde Animal Lda (Rio de Mouro, Portugal) e o Domitor à Pfizer Animal Health (Pennsylvania, EUA). O anti sedativo Antisedan foi igualmente adquirido à Pfizer Animal Health (Pennsylvania, EUA).

Os géis de SDS-PAGE Amersham™ ECL™ Gel 4-12%, foram comprados à GE Healthcare, Bio-Sciences (Suécia). Os anticorpos primários e o anticorpo secundário utilizados no western-blot foram comprados a Santa Cruz Biotechnology® Inc (Heidelberg, Alemanha). Os anticorpos primários usados foram anti-p65 (Ref.: sc-372) e anti-IK $\beta$  (Ref.: sc-371). O anticorpo secundário provém de coelho (anti-rabbit, Ref.: sc-2004).

Os restantes reagentes e solventes utilizados eram de grau analítico.

### 3.2 Animais

Ratos machos Wistar com cerca de 3 meses de idade, divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais cada, foram cedidos pelo Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral (Lisboa, Portugal). Os animais foram providos de água e comida *ad libitum*. As atividades experimentais foram conduzidas de acordo com a Diretiva de 24 de Novembro (nº 86/609 EEC), e legislação portuguesa Decreto-Lei nº 129/92, de 6 de Julho e a Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro.

### 3.3 Preparação das formulações lipossomais

Foram estudadas duas formulações lipossomais de SOD. Na primeira, o enzima foi encapsulado no espaço interno aquoso do lipossoma e passaremos a designar esta formulação por lipossoma peguilado (SOD-Lip). Na segunda formulação, denominada de enzimosoma, o enzima (SOD) foi ligado covalentemente à extremidade ativada do polietilenoglicol associado ao DSPE, localizando-se assim exteriormente ao lipossoma (SOD-Enzimosoma). Foi ainda preparada uma formulação lipossomal designada de magnetossomas, com óxido de ferro (magnetite) encapsulada no espaço interno do lipossoma, para obtenção de imagens por RMN. Em todas as preparações lipossomais foi utilizado DSPE-PEG<sub>2000</sub> conferindo à formulação uma característica de longo tempo de circulação, após administração intravenosa.

#### 3.3.1 Preparação de Lipossomas

Os lipossomas peguilados de SOD para administração no modelo de isquemia/reperfusão têm a seguinte composição lipídica: Egg-PC: Chol: DSPE-PEG com uma razão molar de (1,85: 1: 0,15) e concentração lipídica inicial de 32 µmol/mL.

Os lípidos foram solubilizados em clorofórmio obtendo-se um filme lipídico por evaporação do solvente (Rotavapor RE-111, Buchi, Suíça). Seguidamente, o filme lipídico foi hidratado com a solução aquosa da proteína SOD a encapsular, com uma concentração inicial de 5mg/mL. Através da homogeneização manual com o auxílio e algumas esferas de vidro, obtiveram-se vesículas multilamelares (MLV).

Esta suspensão lipossomal foi congelada a -70°C e a liofilização ocorreu durante a noite (Liofilizador Edwards, Alemanha). O liofilizado obtido foi re-hidratado com manitol 0,28 M em citrato 10 mM a pH=5,6, com um décimo do volume inicial, com agitação vigorosa periódica. Após 30 minutos, adicionou-se tampão citrato 10 mM em NaCl 145 mM, pH=6, de forma a perfazer o volume inicial da formulação. Após 30 minutos, com agitação vigorosa periódica, as vesículas foram dimensionadas através do processo de extrusão (Lipex Thermobarrel Extruder), por filtros com diâmetro de poro decrescente de 0,66, 0,4, 0,2 e 0,1 µm (Nucleopore® Track-Etched Membranes, Whatman®, EUA). A proteína não encapsulada foi separada por ultracentrifugação (Ultracentrífuga L8-60M Beckman Instruments, EUA), a 300 000 g a 4°C e durante 2h 30 minutos, num rotor tipo 70 Ti (Beckman Instruments, EUA) após diluição em tampão de citratos 10 mM em NaCl 145 mM, pH= 6. O precipitado obtido foi suspenso em

tampão de citratos 10 mM em NaCl 145 mM, pH= 6 com um factor de diluição de cerca de 3vezes.

### 3.3.2 Preparação de Enzimossomas

Os enzimossomas de SOD para administração no modelo de isquémia/reperfusão tinham a seguinte composição lipídica: Egg-PC: Chol: Maleimido-PEG-DSPE: PEG-DSPE numa proporção de (68,25: 30,5: 0,75: 0,50). A concentração lipídica inicial foi de 20  $\mu$ mol/mL. O SOD usado nesta formulação tem uma concentração inicial de 1mg/mL. O SOD foi previamente tiolado utilizando o reagente bifuncional (SATA) na razão molar SATA:SOD de 4:1.

#### 3.3.2.1 Preparação do SOD-ATA

Preparou-se uma solução de SOD a 1 mg/mL em tampão de HEPES a 10 mM com NaCl a 140 mM e EDTA a 1 mM, pH= 7,5, e uma solução de SATA a 25,9 mM em N,N-dimetilformamida (DMF). De modo a manter as razões volumétricas de SATA:SOD em 1:200 e molar SATA:SOD em 4:1, adicionou-se a solução de SATA à solução de SOD e incubou-se, com rotação contínua e à temperatura ambiente, durante cerca de 30 minutos.

Seguidamente, separou-se o produto SOD-ATA dos restantes reagentes da reação utilizando uma coluna PD10 (EconoPac® 10 DG, Bio-RAD Laboratories), (exclusão 6 KDa). As frações que contêm SOD foram detetadas monitorizando a absorvência a 280 e a 238 nm.

#### 3.3.2.2 Preparação da formulação lipossomal

A formulação deve ser preparada no mesmo dia da reação de conjugação da proteína com o lipossoma dado que, com o armazenamento, a reatividade do grupo maleimido diminui, reduzindo a eficiência de conjugação.

Quantidades adequadas dos respetivos lípidos foram pesadas solubilizadas em clorofórmio obtendo-se um filme lipídico por evaporação do solvente (Rotavapor RE-111, Buchi, Suíça). Seguidamente, o filme lipídico foi hidratado com tampão citrato a 10 mM com NaCl a 140 mM e EDTA a 1 mM, pH= 6 (Concentração do filme em

tampão de 20  $\mu\text{mol/mL}$ ). Após 30 minutos com agitação frequente e com o auxílio e algumas esferas de vidro, obtiveram-se vesículas multilamelares (MLV). As vesículas foram dimensionadas através do processo de extrusão (Lipex Thermobarrel Extruder), por filtros com diâmetro de poro decrescente de 0,6, 0,4, 0,2 e 0,1  $\mu\text{m}$  (Nucleopore® Track-Etched Membranes, Whatman®, EUA).

### **3.3.2.3 Ligação do SOD-AT aos lipossomas**

Para se proceder à ligação do SOD ao lipossoma foi necessário proceder à ativação (desproteção) do SOD-ATA pela hidroxilamina resultando SOD-AT. De modo a manter a razão volumétrica 10:1 de proteína: solução de ativação de hidroxilamina a 50 mM em citrato a 50 mM e EDTA a 25 mM, adicionou-se esta solução à solução de SOD-ATA preparada anteriormente. Incubou-se durante, pelo menos, 60 minutos à temperatura ambiente, com rotação contínua (reação de desproteção da solução SOD-ATA).

Após diluição da solução de SOD-AT resultante, e também dos lipossomas, ambos com tampão citrato a 10 mM com NaCl a 140 mM e EDTA a 1 mM, pH= 6, adicionou-se solução de SOD-AT à suspensão de lipossomas, segundo a razão 40  $\mu\text{g}$  proteína/ $\mu\text{mol}$  lípido. Incubou-se à temperatura ambiente com rotação contínua, durante a noite.

### **3.3.2.4 Separação da proteína não ligada da dispersão lipossomal**

O produto da reação anterior foi colocado em tubos de ultracentrifuga (Nalgene 3431-2526, 25x89 mm) e o volume foi ajustado para 25 mL com tampão citrato a 10 mM com NaCl a 145 mM, pH=6, de modo a separar a proteína não associada (Ultracentrífuga L8-60M Beckman Instruments, EUA), a 300 000 g a 4°C e durante 2h 30 minutos, num rotor tipo 70 Ti (Beckman Instruments, EUA). O precipitado resultante foi ressuspensionado em 1,5 mL de tampão de citrato 10 mM em NaCl 145 mM, pH= 6.

### **3.3.3 Preparação de magnetolipossomas**

Os magnetolipossomas preparados apresentam a seguinte composição lipídica: Egg-PC: Chol: DSPE-PEG na razão molar de (1,85: 1: 0,15) e uma concentração lipídica inicial de 32  $\mu\text{mol/mL}$ . O procedimento de preparação dos magnetolipossomas é

semelhante ao descrito em 3.3.1 mas em que o filme de lípido foi hidratado com uma suspensão de partículas de óxido de ferro a 1 mg de ferro/ mL em água. Após processo de extrusão os magnetossomas foram separados das partículas de óxido de ferro não encapsuladas, utilizando cromatografia de exclusão de tamanhos, para o que foi utilizada uma coluna PD10 (Bio-RAD) e o eluente tampão de citratos 10 mM em NaCl 145 mM, pH= 6. Foi aplicado 1 mL de amostra de cada vez e recolhidas frações de 1 mL. O procedimento foi repetido até esgotar o volume de amostra de magnetolipossomas provenientes da extrusão. As frações com turbidez, provenientes das diferentes cromatografias, contêm os magnetolipossomas pelo que foram colocadas num mesmo tubo de ensaio.

Procedeu-se de seguida a uma centrifugação concentrativa (Ultracentrífuga L8-60M, Beckman Instruments, EUA) durante 2 horas, a 300 000 g e a 4°C, num rotor tipo 70 Ti (Beckman Instruments, EUA). O precipitado foi suspenso em tampão de citratos 10 mM em NaCl 145 mM, pH= 6, com um fator de diluição de cerca de 3 vezes

### 3.4 Parâmetros de caracterização das formulações

#### 3.4.1 Doseamento de lípido

Para determinar a quantidade de fosfatos presentes nas formulações lipossomais em estudo, usou-se o método de Rouser e colaboradores [Rouser *et al.*, 1969]. Este é um método que quantifica o fosfato inorgânico presente numa amostra. Após colocar as amostras em tubos de ensaio, estas são secas em placa de aquecimento a 170°C. Seguidamente adiciona-se 0,3 mL de ácido perclórico a 70 % a cada tubo e estes são aquecidos a 170°C, em placa de aquecimento durante cerca de 45 minutos, com os tubos de ensaio tapados com um berlinde para que os vapores do ácido não se percam. Esta reação transforma o fosfato orgânico em fosfato inorgânico, considerando-se portanto, que é uma digestão ácida da amostra lipídica que separa o fosfato do fosfolípido. Após arrefecimento da amostra, adiciona-se pela seguinte ordem: 1 mL de água destilada, 0,4 mL de molibdato de amónia a 1,25% (m/v) e 0,4 mL de ácido ascórbico a 5% (m/v). Agitam-se os tubos de ensaio no vortex e há aparecimento de cor após 5 minutos em banho a 100°C. A absorvância é lida a 797nm (Spectrophotometer UV-mini 1240, Shimadzu). Usou-se como curva de calibração uma solução de fosfatos a 0,5 mM, que permitiu obter pontos da reta com a gama de concentrações entre 9 nmol/mL - 40 nmol/mL.



### 3.4.2 Doseamento de proteína

#### 3.4.2.1 Método de Lowry

O método de Lowry modificado [Lowry *et al.*, 1951] foi utilizado para determinar a quantidade de proteína encapsulada nas formulações de SOD Lipossomal e associada aos enzimosomas, nas amostras inicial e final, e ainda nos homogenatos de fígado de rato. Este método utiliza Triton X-100 e SDS de forma a provocar a rutura dos lipossomas e dos enzimosomas. Assim, colocaram-se alíquotas de cada suspensão lipossomal e amostras dos diferentes homogenatos em tubos de ensaio e foram diluídas com água destilada para um volume final de 0,5 mL. Adicionou-se 0,4 mL de SDS a 20%, 0,5 mL de Triton X-100 e 0,1 mL de NaOH 1N. Após agitação, os tubos ficaram cerca de 1 hora em banho a 60°C, até se observar uma solução completamente límpida. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL de reagente de Lowry e agitou-se. Após 10 minutos, adicionou-se 0,1 mL de reagente de Folin diluído 1:1 (v/v) com água, agitaram-se os tubos e esperou-se 45 minutos. As absorvências foram lidas a 750 nm (Spectrophotometer UV-mini 1240, Shimadzu). Como curva de calibração utilizaram-se duas soluções padrão de BSA, de concentrações 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL, obtendo-se uma gama de concentrações de proteína entre 2 µg/mL - 15 µg/mL.

#### 3.4.2.2 Método do TCA

O método de quantificação de proteínas em amostras biológicas no qual se usa ácido tricloroacético, é comumente denominado de método do TCA [Sivaraman *et al.*, 1997]. O princípio deste método é semelhante ao método de Lowry, contudo adiciona-se num primeiro passo ácido tricloroacético a 10% (m/v) de modo a provocar precipitação proteica.

As amostras a quantificar foram colocadas num eppendorf de 2 mL a adicionou-se 1 mL de TCA a 10% (m/v). Centrifugou-se numa centrífuga de bancada Sigma-202 MK (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo, EUA) durante 5 minutos, a 30°C e a 13 000 g. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se ao precipitado os seguintes reagentes pela ordem indicada: 0,05 mL de água destilada, 0,2 mL de SDS a 20%, 0,250 mL de Triton X-100 a 2% e 0,1 mL de NaOH 1N. Os tubos *Eppendorf* estiveram sob agitação contínua durante 5 minutos e seguidamente permaneceram 15 minutos em banho a 60°C. Adicionou-se 1 mL de reagente de Lowry a cada tubo *Eppendorf*, agitou-se e

esperou-se 10 minutos pela adição de 0,1 mL de reagente Folin diluído 1:1 (v/v) com água. As amostras foram agitadas e ficaram em repouso durante 30 minutos após os quais foram lidas as absorvências a 750 nm (Spectrophotometer UV-mini 1240, Shimadzu). Como curva de calibração, utilizou-se uma solução padrão de BSA de 0,2 mg/mL, obtendo-se uma gama de concentrações de proteína de 5 µg/mL a 30 µg/mL.

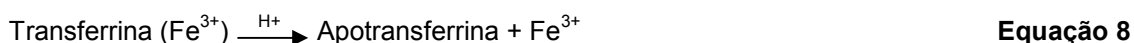
### **3.4.3 Doseamento de ferro**

Foi feito o doseamento de ferro para a formulação de magnetolipossomas que encapsulam óxido de ferro no seu interior. Para isso, 0,01 mL da amostra a quantificar foi tratada com 0,006 mL de Triton X-100 a 20% (v/v) e esperou-se 15 minutos. Seguidamente adicionou-se 0,016 mL de HCl a 25% (v/v) e a amostra ficou em repouso durante 24 horas, á temperatura ambiente. Após 24 horas, adicionou-se 0,968 mL de água destilada A determinação quantitativa de ferro presente nas amostras foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 2-1000 µg/dL (0,3- 179,0 µmol/ L).

O método *Ferro\_2* baseia-se no trabalho de Artiss [Artiss *et al.*, 1981] e Siedel [Siedel, 1984]. O ferro é libertado da transferrina, sob condições acídicas e reduzido ao seu estado ferroso para se combinar com um cromogéneo para medição colorimétrica. Este procedimento realiza a medição direta do ferro, sem um passo de precipitação da proteína e livre de qualquer interferência do cobre endógeno. Este método também contém concentrações elevadas de hidrócloro de guanidina e detergente para evitar a precipitação de proteína com amostras de paraproteínemia e plasma.

O ferro férrico é dissociado da sua proteína de transporte, a transferrina, num meio ácido (Equação 8), sendo simultaneamente reduzido a uma forma ferrosa (Equação 9). O ferro ferroso é, em seguida, complexado com ferrozina, um indicador sensível ao ferro, produzindo um cromóforo colorido que apresenta absorção a 571/ 658 nm (Equação 10).

Equações da reação:



#### 3.4.4 Eficácia de encapsulação/conjugação

Após dosear a proteína e o lípido presente nas amostras inicial e final das duas formulações, calculou-se a eficácia de encapsulação do SOD (E.E.) para os lipossomas e a eficácia de conjugação (E.C.) para os enzimosomas. Para a formulação de magnetossomas, determinou-se também a eficácia de encapsulação mas em relação ao óxido de ferro.

Para isso, recorreu-se á expressão apresentada na equação 11.

$$E. C. / E. E. (\%) = \frac{\frac{[Proteína]_{final}}{[Lípido]_{final}}}{\frac{[Proteína]_{inicial}}{[Lípido]_{inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

#### 3.4.5 Atividade Enzimática

Foi medida a atividade enzimática do SOD nas formulações lipossomais iniciais e finais (SOD-Lip, SOD-Enzimosoma) e do SOD não lipossomal. Para isso, utilizou-se o kit Bioxytech SOD-525 (Oxis International, Inc) e durante 10,2 minutos mediu-se a atividade da amostra inicial e final, em intervalos de 0,3 minutos e ao comprimento de onda de 525 nm. O método Biotech® SOD-525™ baseia-se no aumento da auto-oxidação do 5,6,6a,11b-tetra-hidro-3,9,10-trihidroxibenzo[c]fluoreno (reagente R1), mediada pela SOD, em solução aquosa alcalina para produzir um cromóforo com um máximo de absorvência a 525 nm. O cromóforo ainda não foi isolado nem caracterizado. Ainda neste teste, a interferência de tióis (RSH) tal como o glutathione reduzido, é controlada adicionando à amostra o reagente R2 (1,4,6-trimetil-2-vinilpiridina) que elimina diretamente tióis através de uma rápida reação de alquilação. A medida cinética a 525 nm é realizada após adição de R1. A atividade da SOD é determinada a partir da razão entre as taxas de auto-oxidação na presença (Vs) e na ausência (Vc) de SOD. A razão Vs/Vc, sendo uma função da atividade de SOD é independente do tipo de SOD (Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) a ser medida. A unidade de atividade de SOD-525 é definida como a atividade que duplica a taxa de auto-oxidação do branco controlo (Vs/Vc= 2). A relação entre Vs/Vc e a atividade de SOD é descrita na equação 12.

$$\frac{V_s}{V_c} = 1 + \frac{[SOD]}{\alpha \cdot [SOD] + \beta}$$

Equação 12

Onde,  $V_s$  corresponde à taxa de amostra contendo SOD;  $V_c$  corresponde à taxa média de amostras em branco ( $SOD=0$ );  $SOD$  indica a atividade da SOD na amostra em unidades SOD-525;  $\alpha$  é o coeficiente adimensional e  $\beta$  o coeficiente em unidades de SOD-525. A atividade de SOD ( $V_s/V_c$ ) tem uma relação de 2, enquanto que  $\beta=1-\alpha$ . A determinação de  $\alpha$  e  $\beta$  por medições experimentais num conjunto de amostras de SOD, define  $\alpha= 0,073$  e  $\beta=0,93$  unidades de SOD-525.

Para efetuar este ensaio, a amostra de SOD inicial foi diluída 45 vezes e a amostra final de enzimosomas foi diluída 20 vezes.

#### 3.4.6 Determinação do diâmetro médio das partículas

As determinações dos diâmetros médios das partículas foram feitas por espectrometria de correlação fotónica no aparelho Zetasizer, modelo Nano S (Malvern Instruments, Reino Unido). Os resultados obtidos são o resultado da média de três medições, que por sua vez correspondem a conjuntos de 10 a 17 leituras individuais. O diâmetro desejado deve ser, neste caso,  $<0,13 \mu m$ .

O índice de polidispersão (PDI) foi usado como medida de distribuição de tamanhos. O PDI pode variar entre 0 (monodisperso) e 1 (polidisperso), sendo que  $<0,2$  é já um resultado satisfatório que considera a distribuição de tamanhos como monodisperso.

Para que estes parâmetros possam ser medidos, as amostras foram diluídas 33 vezes com a respetiva solução tampão.

#### 3.4.7 Determinação do potencial zeta

A carga superficial dos enzimosomas e dos magnetossomas foi determinada através da medição do potencial zeta num Zetasizer *nano series* (Malvern Instruments, Reino Unido). O potencial zeta tem por base o movimento das partículas, sujeitas a eletroforese, sendo necessário diluir a formulação lipossomal com água filtrada ( $0,2 \mu m$ ). Os resultados obtidos resultam da média de três medições independentes com vários replicados (até 17) seguindo uma distribuição normal.

### **3.4.8 Purificação com coluna PD10**

As colunas PD10 (EconoPac ® 10 DG, Bio-RAD Laboratories) foram utilizadas para dois tipos de purificação de amostras. Primeiro, na preparação de enzimosomas de modo a separar a SOD-ATA de outros produtos da reacção. Assim, após remover a tampa da coluna e descartar o tampão de proteção, aplicou-se 20 mL de tampão citratos a 10 mM com NaCl a 145 mM e EDTA a 1 mM, pH 6, descartando o eluente. Após este passo de lavagem, aplicaram-se os 3 mL de amostra, os quais eluíram completamente recolhendo-se 3 frações de 3 mL. Por fim, aplicou-se 12 mL do mesmo tampão e os eluídos foram recolhidos em frações de 1 mL. Traçou-se o perfil de eluição através da leitura de absorvências a 238 e 280 nm, correspondendo o primeiro pico de absorvência à SOD-ATA.

Este tipo de coluna foi também utilizado na preparação de magnetossomas, na separação dos magnetossomas do óxido de ferro não encapsulado, aplicando 1 mL de amostra de cada vez e recolhendo 10 frações de 1 mL. O eluente foi tampão citrato a 10 mM com NaCl a 145 mM e EDTA a 1 mM, pH 6.

### **3.5 Técnica de Isquémia/ Reperusão**

A técnica de indução de isquémia/ reperusão hepática em modelo animal foi desenvolvida com a colaboração de médicos-cirurgiões do Hospital Curry Cabral.

Os ratos foram anestesiados com 0,2 mL de Imalgene 1000 (Merial Portuguesa Saúde Animal Lda, Rio de Mouro, Portugal) e Domitor (Pfizer Animal Health, Pennsylvania, EUA), na proporção de 1:1, injetando-se intramuscularmente (i.m.) a anestesia na parte muscular de uma das patas posteriores. Após cerca de 5 minutos, tempo que o animal demora a adormecer, pesou-se o animal e foi feita a tricotomia na parte abdominal. Nesta mesma zona, o animal foi aberto e laqueou-se com um nó a veia porta e a artéria hepática durante 30 minutos. Ao fim deste tempo, foram removidas as laqueações e o corte da cirurgia foi suturado. A administração das formulações a estudar foi feita na veia da cauda antes de se proceder à remoção da laqueação. Depois dos animais serem suturados, administrou-se 0,2 mL do anti sedativo Antisedan (Pfizer Animal Health, Pennsylvania, EUA) na parte muscular de uma das patas posteriores (i.m.) do rato, levando o animal cerca de 5 minutos a acordar.

### **3.6 Recolha de amostras**

Recolheram-se amostras de sangue e de fígado dos ratos. As amostras de sangue foram recolhidas, após o sacrifício do animal, por punção cardíaca. Recolheu-se 1 mL de sangue para análise de hemograma (em tubos com EDTA) e 1 mL para análises bioquímicas.

O fígado, depois de extraído, foi lavado com KCl a 0,154 M, e separado do seguinte modo: um dos lóbulos foi guardado para estudos de anatomia patológica, outro lóbulo foi guardado para estudos de ressonância magnética nuclear (NMR). Foram ainda retiradas seis amostras de cerca de 0,5 g de fígado e criopreservadas instantaneamente em azoto líquido, para posterior preparação de extratos nucleares e citosólicos.

#### **3.6.1 Preparação de extratos citosólicos e nucleares**

Prepararam-se extratos nucleares e citosólicos a partir dos homogenatos de fígado de rato. Os extratos foram preparados a partir de tecido hepático armazenado a -80 °C, sendo que todas as operações foram realizadas a 0°C. Estes extratos foram obtidos através de uma série de centrifugações, com velocidade crescente, numa supercentrífuga Beckman J2-MC usando o rotor JA-20, recorrendo a tampões com vários inibidores de proteases e detergentes na sua composição. Assim, após homogeneização das amostras hepáticas, com tampão de homogeneização [HEPES/ KOH 10 mM pH=7,6, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, KCl a 10 mM, Sacarose 300 mM, EGTA 0,1 mM, benzamidina 1,5 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL, DTT a 2 mM e Nonidet P-40 a 0,1% (v/v)], num homogeneizador de Potter (Multifixer, Concessus S.A.), adicionou-se PMSF e centrifugou-se o homogenato durante 30 segundos, a 4°C e a 270 g (1500 rpm) na supercentrífuga. Desprezou-se o sedimento e o sobrenadante foi de novo centrifugado, agora durante 3 minutos, a 1 480 g (3500rpm) e a 4°C. Neste ponto, o sobrenadante e o sedimento tiveram destinos diferentes, sendo que o sobrenadante originará o extrato citosólico, e o sedimento o extrato nuclear. O sobrenadante foi centrifugado durante 20 minutos a 17 400 g (12 200 rpm), a 4°C, correspondendo o sobrenadante obtido ao extrato citosólico. O sedimento referido anteriormente, foi ressuspensionado em tampão de homogeneização, e centrifugado durante 3 minutos a 750 g (1500 rpm), a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise nuclear [HEPES/ KOH a 20 mM pH=7,6, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, NaCl a 420 mM, glicerol 25% (v/v), EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 mM,

benzamidina 1,5 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL, DTT a 2 mM e PMSF 1 mM]. A amostra foi mantida em gelo durante 30 minutos, com agitação manual periódica, e ao fim deste tempo centrifugou-se numa centrífuga de bancada (Sigma 202 MK) durante 10 minutos a 10 000 g, a 4°C. O sobrenadante obtido corresponde à fracção nuclear do tecido hepático original.

### 3.7 Doseamento de biomarcadores de Isquémia/ Reperfusão hepática

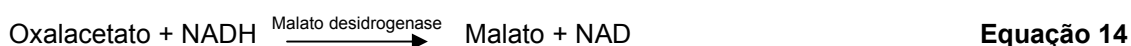
#### 3.7.1 Aspartato aminotransferase (AST)

A determinação quantitativa da atividade do aspartato aminotransferase (AST) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0-1000 U/l, sendo que uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de NAD<sup>+</sup> por minuto, a pH 7,6 e 37°C.

O método do AST baseia-se no trabalho de Karmen [Karmen *et al.*, 1955]. Este procedimento foi posteriormente modificado por H.U.Bergmeyer [Bergmeyer *et al.*, 1978]. Os reagentes da AST são formulados de acordo com as recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC).

O ensaio de doseamento da atividade do AST baseia-se na medição do oxaloacetato formado através do uso de uma reação acoplada dependente do NADH. Assim, pode seguir-se a formação do oxaloacetato através da oxidação do NADH pelo oxaloacetato catalisada pela malato desidrogenase (Equação 14). A oxidação do NADH é medida pelo decréscimo de absorvância a 340/ 410 nm. A reação é iniciada pela adição de α-cetoglutarato como segundo reagente (Equação 13).

Equações da reacção:

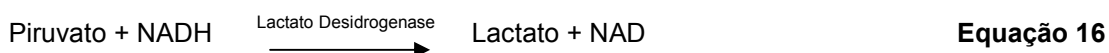
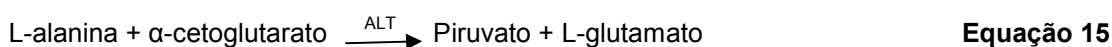


### 3.7.2 Alanina aminotransferase (ALT)

A determinação quantitativa da atividade da alanina aminotransferase (ALT) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0- 1100 U/l, sendo que uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NAD}^+$  por minuto, a pH 7,6 e 37°C.

O método da ALT baseia-se no trabalho de Wroblewski e LaDue [Wroblewski & LaDue, 1956]. O procedimento foi posteriormente modificado por H.U.Bergmeyer [Bergmeyer *et al.*, 1978]. O método usa uma reação enzimática acoplada, dependente do NADH, para a medição do piruvato formado pela ALT. Usa-se para este efeito NADH e lactato desidrogenase (Equação 16). No ensaio de doseamento da ALT a reação é iniciada pela adição de  $\alpha$ -cetoglutarato como segundo reagente (Equação 15). A concentração de NADH (Equação 16) é medida pela sua absorvância a 340/ 410 nm e a diminuição da taxa de absorvância é proporcional à actividade da alanina aminotransferase.

Equações da reação:



### 3.7.3 Gama-glutamil transferase (GGT)

A determinação quantitativa da atividade do gama-glutamil transferase (GGT) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0-1200 U/l, sendo que uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de 5-amino-2-nitro-benzoato por minuto, a pH 8,25 e 30°C.

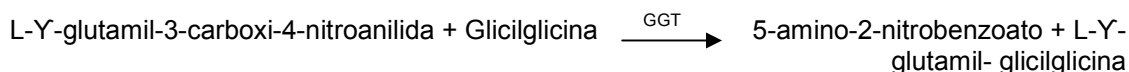
O método ADVIA do GGT baseia-se no procedimento descrito por L.M. Shaw [Shaw *et al.*, 1977].

No ensaio de doseamento do GGT, é usado um substrato sintético (L-Y-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida), em que a glicilglicina atua como recetor do resíduo de Y-glutamil, sendo libertado 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB) (Equação 17). O produto



libertado tem uma absorção máxima próximo de 400 nm. A taxa de formação é medida por teste fotométrico a 410/478 nm como uma reação com cinética de ordem zero.

#### **Equação 17**



#### **3.7.4 Fosfatase alcalina (ALP)**

A determinação quantitativa da atividade da fosfatase alcalina (ALP) presente no soro foi doseada utilizando o sistema ADVIA ®Chemistry Systems (Bayer HealthCare). O intervalo analítico encontra-se entre 0- 1100 U/l, sendo que uma unidade (U) é a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, a pH 10,3-10,4.

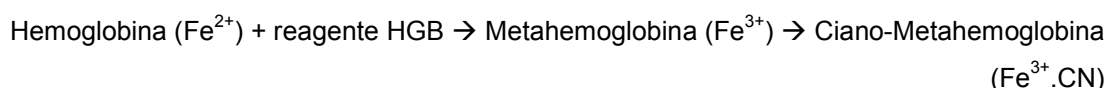
O método do (ALP) baseia-se no trabalho de Tietz [Tietz, 1980]. O ALP hidrolisa o substrato pNPP formando p-nitrofenol (Equação 18). A reação é seguida pela medição espectral da velocidade de formação do p-nitrofenol a 410/ 478 nm. É utilizado um tampão de 2-amino-2-metil-1 propanol (AMP) para manter o pH da reação a 10,3-10,4. Adicionam-se íons de magnésio e zinco ao tampão AMP para ativar e estabilizar o enzima.



#### **3.8 Hemograma**

O hemograma das amostras de sangue foi realizado no sistema ADVIA ® 120 Hematology System (Siemens).

Para quantificar a hemoglobina presente nas amostras, utilizou-se um reagente que contém cianeto de potássio (20 mmol/L) e óxido de dimetillaurilamina a 2% (reagente HGB). Assim, na fase inicial da reação, os eritrócitos são lisados e libertam a hemoglobina (Hb). Seguidamente, o ferro do grupo heme da hemoglobina é oxidado, passando do estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ao estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). O  $\text{Fe}^{3+}$  combina-se, posteriormente, com o cianeto do reagente utilizado, formando o produto da reação cuja transmitância é lida a 546 nm (Equação 19).

**Equação 19**

A contagem leucocitária, ou seja a percentagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos presentes nas amostras foi obtida recorrendo ao uso de 3 reagentes específicos para o sistema ADVIA 120, nomeadamente ADVIA 120 PEROX 1 (dodecil sulfato de sódio a 0,36 mmol/L, sorbitol a 620 mmol/L, NaCl a 8,35 mmol/L, formaldeído a 5,5%, BRIJ-35 a 0,1 mmol/L), ADVIA 120 PEROX 2 (4-Cloro-1-naftol a 44,8 mmol/L e dietilenoglicol a 99,2%) e ADVIA 120 PEROX 3 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,3 % e estabilizador). Deste modo, inicialmente ocorre a lise dos eritrócitos provocada por *stress* térmico combinado com o uso de surfactantes (dodecil sulfato de sódio e BRIJ-35). Ocorre fixação dos leucócitos pelo formaldeído e o meio hipertónico causa algum encolhimento e plasmólise dos mesmos, aumentando o índice de refração das células e melhorando a deteção dos linfócitos através do ruído. O 4-Cloro-1-naftol do reagente ADVIA 120 PEROX 2 serve como substrato que permite ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do ADVIA 120 PEROX 3 a formar um precipitado negro no interior dos grânulos dos leucócitos, com atividade peroxidásica como descrito na equação 20.



Neste ensaio, as células absorvem luz proporcionalmente à sua atividade peroxidásica e a dispersão de luz é proporcional ao volume celular. Assim, os dados de dispersão de luz e de absorvência permitem identificar populações de células distintas. A análise destas populações tem ainda como base a sua área, densidade e posição sendo que o número de células em cada população é depois processado.

### 3.9 SDS-PAGE e Western Blot

O grau de inflamação induzido pela isquemia/ reperfusão hepática pode ser avaliada e estudada através da indução da atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Por isso, e usando os extratos hepáticos nucleares e citosólicos recorreu-se à técnica de SDS-PAGE e Western Blot para a medição dos níveis de p65 e I $\kappa$ B- $\alpha$ , no citosol e no núcleo.

As amostras com cerca de 20  $\mu$ g de proteína/ mL, foram aplicadas num gel de 4-12 % de poliacrilamida (Amersham<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> Gel 4-12%, GEHealthcare Bio-Sciences, Suécia) e corridas durante 65 minutos à voltagem constante de 145 V, utilizando um marcador molecular adequado (Protein mixture, GEHealthcare, UK limited).

Após separação das várias proteínas dos extratos nucleares e citosólicos em função da razão carga/massa através de SDS-PAGE, estas foram transferidas para uma membrana de PVDF, através de imunotransferência (Western-Blot). A membrana foi seguidamente bloqueada com uma solução de leite em pó a 5% em tampão fosfato salino (PBS), durante 60 minutos sob agitação contínua, à temperatura ambiente. De seguida, parte da membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology ® Inc, ref.: sc-372)) e outra parte da membrana com o anti- I $\kappa$ B $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology ® Inc, ref.: sc-371), ambos diluídos 1:750, durante 60 minutos. Após esta incubação, as membranas foram lavadas com uma solução de PBS 1X e Tween 20 a 0,1%, numa sequência de tempos de 15 minutos, 15 minutos, 5 minutos e 5 minutos. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology ® Inc, anti-rabbit, ref.: sc-2004), diluído 1:1000, durante 60 minutos, com agitação e à temperatura ambiente. Por fim, procedeu-se a nova lavagem da membrana com PBS 1X e com agitação, em 4 períodos de tempo: 15 minutos, 15 minutos, 5 minutos, 5 minutos.

Na revelação por quimiluminescência da membrana de PVDF (ImageQuant LAS 500, GE Healthcare), incubou-se a membrana 1 minuto com a solução de ECL Prime (GE Healthcare).

A quantificação de proteína presente nas bandas de western-blot foi feita através do *software ImageJ* (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.), o qual permite fazer a comparação da intensidade das manchas obtidas depois de normalização dos resultados do western blot por comparação com as membranas resultantes do SDS-PAGE correspondente.

### **3.10 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA Fator Único. A probabilidade aceitável para uma diferença significativa entre os valores médios foi de  $p < 0,05$  ( $F_{crit} < F$ ).

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



## 4. Resultados e Discussão

---



#### **4.1 Desenvolvimento e caracterização das formulações**

Neste estudo de tratamento de situações de isquemia reperfusão hepática foram utilizadas como agentes terapêuticos duas formulações lipossomais com diferentes características e comparadas com a atividade terapêutica do enzima em solução (SOD “livre”). A primeira, a que chamaremos SOD-Lip consiste numa formulação lipossomal de longo tempo de circulação em que é utilizado o PEG como revestimento hidrófilo da membrana lipossomal. Nesta formulação, o SOD encontra-se encapsulado no espaço interno aquoso dos lipossomas. A segunda formulação, a que chamaremos SOD-Enzimossoma consiste numa formulação lipossomal, igualmente de longo tempo de circulação em que o PEG é igualmente o agente de revestimento. No entanto, o SOD encontra-se, por construção, ligado covalentemente a uma extremidade ativada com um grupo maleimida de uma molécula de PEG. Neste caso, ao contrário do anterior, a atividade enzimática da SOD é exercida sem a prévia destruição da partícula, como acontece na primeira formulação, pois o substrato não tem a capacidade de atravessar a membrana lipossomal em concentrações eficazes.

##### **4.1.1 Lipossomas**

Os lipossomas de 2ª geração de longo tempo de circulação, revestidos com PEG, transportam o SOD no seu espaço interno aquoso, sendo necessário a destruição das vesículas e posterior libertação do SOD para que este enzima exerça o seu papel antioxidante em locais de inflamação, como em situações de isquemia/ reperfusão hepática.

A formulação de SOD-Lip estudada (Egg-PC: Chol: DSPE-PEG) é composta por partículas cujo diâmetro médio obtido foi de 0,14  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Este tamanho foi conseguido através do processo de extrusão no qual se fez passar de uma forma sequencial, a suspensão lipossomal por filtros com poros de diferentes tamanhos, de modo a reduzir o tamanho das partículas. Assim, utilizaram-se filtros de 0,6, 0,4 e 0,2  $\mu\text{m}$ , pelos quais se fez passar a amostra 1 vez. Utilizou-se ainda um filtro de 0,1  $\mu\text{m}$  pelo qual a amostra foi passada 3 vezes de modo a serem obtidas partículas mais homogêneas em termos de dispersão de tamanhos. Nesta formulação, conseguiu-se um índice de polidispersão de 0,07 o qual é considerado bom, uma vez que considera a distribuição de tamanhos como monodisperso. Dado que o procedimento para a obtenção desta formulação já se encontrava em rotina no laboratório, não se procedeu



a estudos de incorporação mas sim à aprendizagem do método. Por isso realizaram-se apenas as experiências necessárias à sua aprendizagem e compararam-se os resultados com os obtidos no laboratório.

Assim, conseguindo obter lipossomas pequenos ( $< 0,15 \mu\text{m}$ ) de longo tempo de circulação garante-se que estes consigam chegar aos seus locais alvo, ou seja, aos tecidos inflamados, pois estes são capazes de sair da circulação sanguínea e se dirigirem para o tecido inflamado, atravessando o endotélio e escapando das células do sistema fagocitário mononuclear.

**Tabela 1-** Parâmetros de caracterização da formulação de lipossomas com SOD (SOD-Lip). Os resultados são a média  $\pm$  desvio padrão de  $n=3$  experiências independentes.

Formulação / Parâmetro	[Lip]i ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[Lip]f ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[SOD]i ( $\mu\text{g/mL}$ )	[SOD]f ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E. (%)	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	PDI
SOD-Lip	$23 \pm 1$	$42 \pm 2$	$3502 \pm 73$	$606 \pm 14$	$9 \pm 1$	0,14	0,07

[Lip]i- Concentração lipídica inicial ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [Lip]f- Concentração lipídica final ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [SOD]i- Concentração inicial de SOD ( $\mu\text{g/mL}$ ), [SOD]f- Concentração final de SOD ( $\mu\text{g/mL}$ ), E.E.- Eficácia de encapsulação (%), Tamanho ( $\mu\text{m}$ ) e PDI- Índice de Polidispersão.

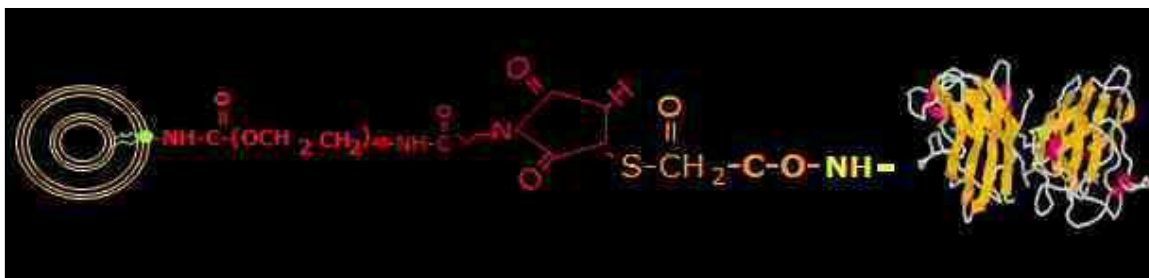
A eficácia de encapsulação de SOD para a formulação de SOD-Lip (obtida pela equação 11 dos Materiais e Métodos) foi de 9%. Este valor embora baixo, situa-se dentro dos valores de rotina, os quais rondam os 10% [Corvo, 1998]. Durante a preparação dos lipossomas de longo tempo de circulação, pelo método DRV, a hidratação do liofilizado é feita em dois passos, sendo que no primeiro a hidratação é feita com pouco volume de tampão (um décimo do volume total) e só no segundo passo se perfaz o volume final. Este procedimento ajuda a aumentar a eficácia de encapsulação do SOD nos lipossomas. Contudo, o processo de extrusão diminui a eficácia de encapsulação do SOD, uma vez que durante a extrusão alguns lipossomas rompem e o SOD tem tendência a escapar do espaço interno aquoso, onde há uma grande concentração de proteína, para a fase externa.

Uma abordagem possível para prevenir a perda de proteína do lipossoma, seria carregar a proteína com uma carga oposta à da bicamada do lipossoma.

#### 4.1.2 Enzimossomas

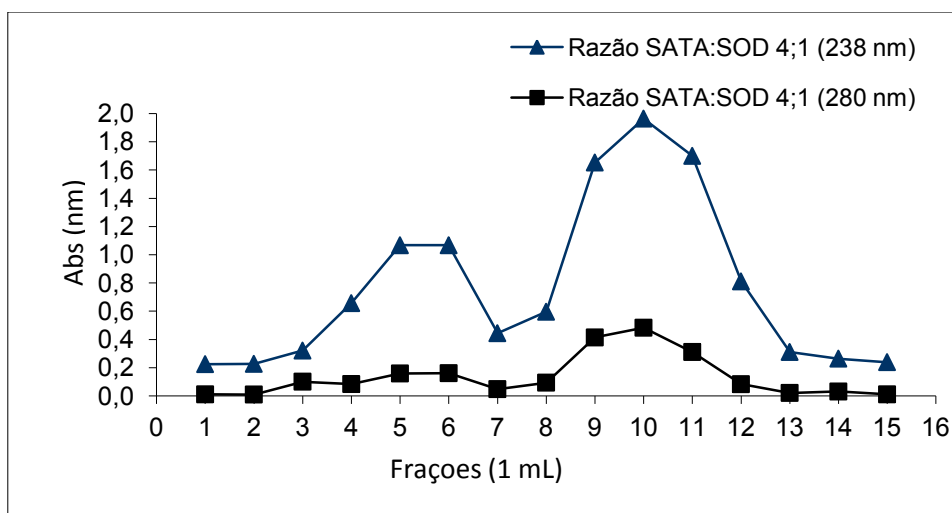
A administração do enzima antioxidante SOD em lesões induzidas por *stress* oxidativo após isquemia/reperfusão hepática poderá diminuir os danos causados por esta situação, após transplantes de fígado e cirurgias hepáticas. De forma a aumentar o tempo de semi-vida desta proteína no sangue e a sua acumulação no local de inflamação, prepararam-se enzimossomas, uma formulação lipossomal que contém o SOD modificado ligado covalentemente à bicamada fosfolipídica. Estas vesículas apresentam propriedades únicas devido à sua composição e tamanho, de entre as quais se destacam a sua pequena dimensão, a capacidade de longo tempo de circulação e o facto de não ser necessária a sua destruição para que o SOD exerça a sua função [Cruz *et al.*, 2009]. Assim, o fosfolípido principal presente na sua constituição é a fosfatidilcolina proveniente de ovo e o colesterol também está presente em grande proporção de forma a conferir uma certa rigidez à bicamada lipídica. A inserção de polietilenoglicol de massa molecular 2000 (DSPE-PEG), permite mascarar as vesículas do sistema imunitário, conferindo então aos enzimossomas um longo tempo de circulação. A inserção de DSPE-PEG ativado com maleimida vai permitir a ligação do SOD à vesícula através do grupo maleimido.

Ao contrário do outro sistema lipossomal estudado, os enzimossomas possuem atividade enzimática na forma intacta, podendo exercer essa atividade sem que haja a necessidade de destruir a vesícula. Este facto é conseguido devido à ligação do SOD à superfície do lipossoma (Figura 5). A conjugação do SOD com os lipossomas é feita modificando a proteína, ao introduzir grupos sulfidrilo (-SH), usando N-Succinimidil-S-Acetilacetato (SATA), os quais reagem subsequentemente com os grupos maleimida do lípido reativo (1,2-Distearoil-*sn*-Glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[Maleimida (polietilenoglicol) 2000]) (Maleimida-PEG-DSPE) presentes à superfície dos lipossomas. Assim, o SATA promove a formação de uma ligação covalente estável pela reação do éster NHS com aminas primárias da proteína, resultando uma ligação amida (SOD-ATA). Posteriormente, é ainda necessário desacetilar o SOD-ATA, através da incubação com hidroxilamina e EDTA, obtendo-se a forma final SOD-AT.



**Figura 5-** Ilustração da ligação do SOD modificado (Cu, Zn-SOD-SH) ao DSPE-PEG (2000) Maleimida, presente na superfície do lipossoma. Adaptado de Vale *et al.*, 2006.

A figura 6 representa o perfil de eluição característico da separação da mistura SOD-SATA por cromatografia de exclusão molecular através de uma coluna PD10 (EconoPac® 10 DG, Bio-RAD Laboratories). O primeiro pico corresponde ao SOD modificado (SOD-ATA) e o segundo pico pertence ao SATA que não reagiu com a proteína.



**Figura 6-** Perfil tipo de eluição obtido para a separação de SOD-ATA do SATA por cromatografia de exclusão molecular (coluna PD10) usando como eluente tampão de citratos a 10 mM com NaCl a 140 mM e EDTA a 1 mM, a pH 6. Absorvência medida a 238 e 280 nm.

A conjugação de SOD à superfície dos lipossomas foi estudada e os resultados estão apresentados na Tabela 2. A eficácia de conjugação média (obtida pela equação 11 dos Materiais e Métodos) foi de 25%, valor consistente com valores obtidos

anteriormente no nosso laboratório. Este resultado pode considerar-se satisfatório tendo em conta os 40% referidos na literatura [Vale *et al.*, 2006]. O diâmetro médio obtido para os enzimosomas, foi de 0,15  $\mu\text{m}$  (Tabela 2), confirmando a produção de vesículas  $\leq 0,15 \mu\text{m}$ , as quais conseguem escapar da circulação sanguínea e direcionarem-se para os locais alvo, os locais de inflamação, sem serem reconhecidas pelo sistema imunitário, uma vez que estes enzimosomas estão revestidos com PEG. Nesta formulação, conseguiu-se um índice de polidispersão médio de 0,13 assumindo-se como bom, uma vez que considera a distribuição de tamanhos como monodisperso.

**Tabela 2-** Parâmetros de caracterização, da formulação de enzimosomas com SOD (SOD-Enzimo). Os valores indicados correspondem a cinco experiências independentes (n=5).

Formulação/ Parâmetro	[Líp]i ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[Líp]f ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[SOD]i ( $\mu\text{g/mL}$ )	[SOD]c ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.C (%)	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	PDI
SOD- Enzimo 1	17	23	1002	429	32	0,12	0,11
SOD- Enzimo 2	16	31	1162	455	21	0,17	0,12
SOD- Enzimo 3	16	26	1262	342	16	0,15	0,12
SOD- Enzimo 4	17	33	973	672	36	0,15	0,14
SOD- Enzimo 5	18	42	1000	523	22	0,16	0,18
Média $\pm$ SD	17 $\pm$ 1	31 $\pm$ 7	1080 $\pm$ 126	484 $\pm$ 123	25 $\pm$ 8	0,15 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03

[Líp]i- Concentração lipídica inicial ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [Líp]f- Concentração lipídica final ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [SOD]i- Concentração de SOD incubado ( $\mu\text{g/mL}$ ), [SOD]c- Concentração de SOD conjugado ( $\mu\text{g/mL}$ ), E.C.- Eficácia de conjugação (%), Tamanho ( $\mu\text{m}$ ) e PDI- Índice de Polidispersão.

#### 4.1.3 Magnetolipossomas

O uso de magnetolipossomas revestidos com PEG, e com óxido de ferro (IO) no seu interior, é uma estratégia em crescimento para entrega do agente de contraste referido e o seu uso como forma de diagnóstico em imagiologia através de Ressonância Magnética Nuclear (NMR). Na formulação usada neste trabalho (Egg-PC: Chol: DSPE-

PEG) o agente de contraste é composto por nanopartículas de óxido de ferro com 0,01  $\mu\text{m}$ .

Os magnetolipossomas obtidos apresentaram um diâmetro de 0,13  $\mu\text{m}$  (Tabela 3). Este tamanho foi conseguido após o processo de extrusão, no qual se fez passar a amostra por filtros de 0,8, 0,6, 0,4 e 0,2  $\mu\text{m}$ , uma vez, e ainda por filtro de 0,1  $\mu\text{m}$  cinco vezes. O tamanho das partículas produzidas considera-se satisfatório uma vez que nestas condições, as partículas conseguem difundir-se pelos capilares dos locais de inflamação, infecção ou tumor, os quais apresentam permeabilidade aumentada, garantindo a entrega do agente de contraste. Nesta formulação, conseguiu-se um índice de polidispersão de 0,092 o qual é satisfatório, uma vez que considera a distribuição de tamanhos como monodisperso. O potencial zeta foi também determinado, -1,55 mV, indicando que a vesícula não apresenta praticamente carga superficial, devido à sua composição lipídica e pelo fato de apresentar PEG na superfície da bicamada.

A eficácia de encapsulação obtida para as partículas de óxido de ferro foi de 22%, a qual embora baixa não é possível ser comparada com outros valores da literatura uma vez que não existem dados com esta informação pois, é a primeira vez que se realiza este estudo.

**Tabela 3-** Parâmetros de caracterização da formulação de magnetolipossomas com óxido de ferro (IO). Os resultados apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experiências independentes.

Formulação	[Líp]i ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[Líp]f ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[IO]i ( $\mu\text{g/mL}$ )	[IO]f ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E (%)	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	PDI
Magnetolipossomas	27 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	153	14	22	0,13	0,09

[Líp]i- Concentração lipídica inicial ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [Líp]f- Concentração lipídica final ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [IO]i- Concentração inicial óxido de ferro ( $\mu\text{g/mL}$ ), [IO]f- Concentração final de óxido de ferro ( $\mu\text{g/mL}$ ), E.E.- Eficácia de encapsulação (%), Tamanho ( $\mu\text{m}$ ) e PDI- Índice de Polidispersão.

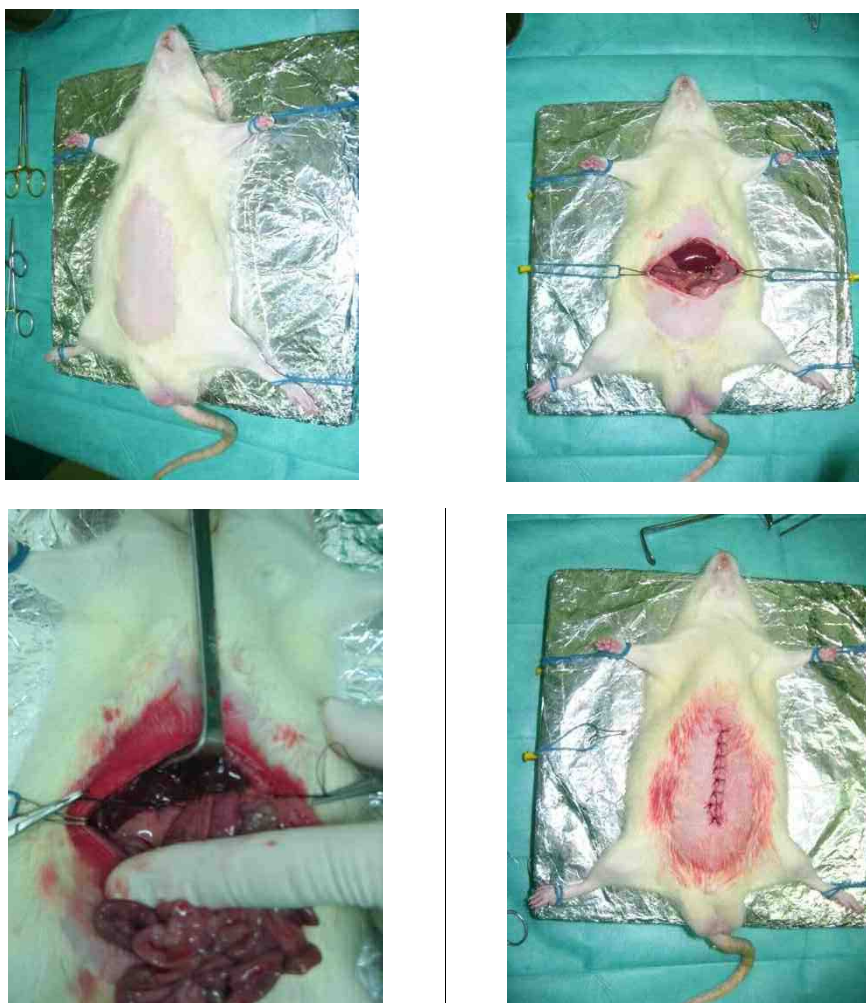
### 4.2 Modelo de isquemia/reperfusão

A atividade terapêutica de enzimosomas de SOD, bem como de lipossomas de longo tempo de circulação foi avaliada num modelo de isquemia/ reperfusão hepática em ratos Wistar com cerca de 3 meses.

Para isso, foi necessário otimizar vários procedimentos experimentais como o procedimento cirúrgico de indução da isquemia/reperfusão (ponto 3.2.1), bem como os tempos de isquemia e posterior recolha de amostras de sangue e de fígado (ponto 3.2.2). Nestes estudos *in vivo* administraram-se duas formulações de SOD, na forma de lipossomas e enzimosomas, bem como SOD na sua forma livre, sendo que o assunto referente ao tratamento com este enzima será abordado no ponto 3.2.3. Assim, de modo a avaliar o efeito, protetor ou não, do SOD administrado avaliaram-se diferentes parâmetros. Nas análises bioquímicas foi feita a determinação da atividade dos enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT). Realizou-se também hemograma e dois dos lóbulos de fígado foram usados para análise de anatomia patológica. Os extratos proteicos hepáticos correspondentes quer à fração nuclear, quer à fração citosólica, foram analisados por SDS-PAGE seguido de *western-blot*, de modo a quantificar os níveis de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B $\alpha$ .

#### 4.2.1. Procedimento experimental do modelo de I/R

De modo a interromper o fluxo sanguíneo hepático temporariamente, recorreu-se a uma técnica desenvolvida pelo grupo de investigação do *i.Med* em conjunto com médicos –(e cirurgiões) do Hospital de Curry Cabral. O fornecimento de sangue para o fígado foi interrompido através de um nó/ clampagem ao nível quer da artéria hepática, quer da veia porta (Figura 7). A reperfusão iniciou-se no momento em que o nó foi rompido, sendo que 1 a 2 minutos antes da reperfusão se administrou, na cauda e intravenosamente (i.v.), a dose determinada das formulações em estudo.



**Figura 7-** Fotografias referentes aos vários momentos cirúrgicos de isquemia/ reperusão induzida.

#### **4.2.2 Otimização do tempo da I/R induzida para avaliação de parâmetros hepáticos**

Foram experimentados diferentes tempos de isquemia/reperusão e diferentes tempos para a recolha das amostras de sangue e de fígado (sacrifício do animal). Inicialmente induziu-se isquemia durante 2 horas e recolheram-se as amostras, de sangue e fígado, 48 horas após a cirurgia. Contudo, observou-se que para este tempo de isquemia, os animais apresentavam sinais de sofrimento e não recuperaram da intervenção cirúrgica. Assim, alterou-se o tempo de isquemia/reperusão para 30 minutos e recolheram-se as amostras 48 horas após a indução de I/R. Com estas condições, concluiu-se que 48 horas era demasiado tempo para a recolha das amostras, uma vez que os parâmetros em análise (AST, ALT, ALP e GGT), nos animais com isquemia eram semelhantes aos dos animais controlo. Assim, optou-se por se realizar os estudos *in vivo* em animais com isquemia induzida durante 30

minutos, e posterior sacrifício para recolha das amostras de sangue e fígado, 24 horas após a cirurgia.

#### 4.2.3. Tratamento

Os estudos *in vivo* foram feitos com a formulação de lipossomas de longo tempo de circulação, que contêm o enzima SOD no espaço interno aquoso, e com enzimosomas preparados a partir de uma razão SATA:SOD de 4:1 em que o SOD está ligado covalentemente à superfície da vesícula. As características das formulações administradas estão presentes na tabela 4.

**Tabela 4-** Parâmetros de caracterização das formulações de lipossomas com SOD (SOD-Lip) e enzimosomas de SOD (SOD-Enzimo) administradas.

Formulação	[Líp]i ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[Líp]f ( $\mu\text{mol/mL}$ )	[SOD]i ( $\mu\text{g/mL}$ )	[SOD]f/c ( $\mu\text{g/mL}$ )	E.E./E.C. (%)	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	PDI
SOD-Lip	23	42	3502	606	9	0,14	0,07
SOD-Enzimo	18	42	1000	523	22	0,16	0,18

[Líp]i- Concentração lipídica inicial ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [Líp]f- Concentração lipídica final ( $\mu\text{mol/mL}$ ), [SOD]i- Concentração de SOD inicial/incubada ( $\mu\text{g/mL}$ ), [SOD]f/c- Concentração de SOD final/ conjugada ( $\mu\text{g/mL}$ ), E.E./E.C.- Eficácia de encapsulação/ conjugação (%), Tamanho ( $\mu\text{m}$ ) e PDI- Índice de Polidispersão.

As duas formulações administradas, SOD-Lip e SOD-Enzimo, apresentam diferentes valores de eficácias de encapsulação do SOD. A eficácia de encapsulação do SOD nos lipossomas é de 9%, valor este que apesar de baixo encontra-se dentro dos valores normais. Por sua vez, a eficácia de encapsulação aumenta quando a formulação é composta por enzimosomas de SOD, obtendo-se 22%. A base destas diferenças de valores reside nos diferentes procedimentos de preparação das duas formulações, nomeadamente no local onde se encontra a proteína na vesícula lipídica. Assim, os lipossomas com SOD (SOD-Lip) são preparados pelo método DRV (desidratação-re-hidratação), o qual é indicado para incorporar moléculas hidrófilas no seu interior, como é o caso do SOD. Contudo, ao longo do processo há perdas de proteína, nomeadamente no processo de dimensionamento (extrusão). No caso dos enzimosomas de SOD (SOD-Enzimo), forma preparados pelo método MLV, um dos



procedimentos mais simples na obtenção de vesículas multilamelares. Para isso, o SOD foi sujeito a uma modificação química de forma a permitir a sua ligação com o PEG presente na bicamada lipídica. Desta forma, considera-se que o valor de 22% na eficácia de encapsulação desta formulação é devida à forte ligação covalente do enzima à bicamada lipídica. No entanto, é de salientar que ambas as formulações possuem a mesma razão final enzima/lípido (12-14 µg/µmol) o que faz que em termos de eficiência de transporte sejam equivalentes.

Quanto ao tamanho do diâmetro médio das duas formulações, obtiveram-se valores dentro do esperado ( $\leq 0,15$  µm), 0,14 µm para SOD-Lip e 0,16 µm para SOD-Enzimo, considerando que ambos os tipos de vesículas conseguem chegar ao seu local de ação, os locais de inflamação hepáticos, provocados pela isquemia/ reperfusão.

Os índices de polidispersão de ambas as formulações são satisfatórios (0,07 e 0,18) uma vez que se encontram em situações de monodispersão, refletindo a uniformidade no tamanho das vesículas produzidas.

O potencial zeta da formulação de enzimosomas foi medido e apresenta um valor de -4mV. Esta medição foi feita apenas para confirmar que a superfície dos enzimosomas apresenta carga nula, sendo que o valor obtido pode ser considerado baixo ou quase nulo.

O comportamento destas duas formulações (SOD-Lip e SOD-Enzimo) foi ainda comparado com o da SOD “livre”. As doses administradas, bem como a atividade do enzima nas três situações seguem na tabela 5.

**Tabela 5-** Doses, e atividade enzimática correspondente de SOD, na forma “livre” (SOD “livre”), lipossomal (SOD-Lip), e em enzimosomas (SOD-Enzimo), administradas por animal.

Formulação	[SOD] na formulação (µg/mL)	Volume administrado (mL)	SOD/ rato (µg)	Retenção de atividade enzimática do SOD (%)
SOD “livre”	1000	0,2	200	100
SOD-Lip	303	0,2	61	85
SOD-Enzimo	523	0,2	105	37

$([SOD]e/C)/[Lip]f = 12 - 14 \text{ µg/µmol}$

A administração de SOD quer na forma livre (SOD “livre”), em lipossomas (SOD-Lip) ou em enzimosomas (SOD-Enzimo), foi feita intravenosamente (i.v.) na veia da cauda do rato, cerca de 1 a 2 minutos antes de se iniciar a reperfusão hepática. Quanto ao SOD “livre”, administrou-se 200 µg de proteína, quantidade superior às utilizadas nas formulações lipossomais. Como previsível, a retenção de atividade enzimática do SOD diminuiu quando foi incorporado o SOD num sistema de entrega de fármacos, neste caso os lipossomas e os enzimosomas. No caso dos enzimosomas, a atividade de SOD (37%) é inferior à dos lipossomas (85%) pois no primeiro caso a proteína encontra-se ligada covalentemente à superfície da vesícula. Este procedimento pode diminuir a retenção de actividade enzimática, mas apresenta como vantagem a não necessidade da destruição da partícula para o enzima exercer a sua função antioxidante nos locais de inflamação do fígado. As quantidades administradas relativas dos enzimas foram corrigidas tendo em conta estas perdas de atividade enzimática. Assim, as doses de SOD administradas, apresentam diferenças nas quantidades injetadas, uma vez que se pretende que a atividade enzimática teórica seja semelhante em ambas as formulações, sendo necessário reajustar a quantidade injetada. Portanto, apesar da quantidade de SOD administrada na forma de enzimosoma ser quase o dobro da SOD lipossomal administrada, a atividade esperar-se-ia ser semelhante.

Neste estudo utilizaram-se seis grupos de animais: 1) o grupo *Controlo*, que serve como controlo negativo pois os animais deste grupo não foram submetidos nem a anestesia, nem a cirurgias nem à administração de alguma formulação. Os animais deste grupo apenas foram sacrificados no dia da colheita do fígado e do sangue. 2) O grupo *SHAM*, é o grupo de animais que foi sujeito a anestesia durante 30 minutos, tendo sido acordados após este tempo. Foram sacrificados 24 h após esta situação; 3) Os animais do grupo *Op*, que significa “Operados”, foram anestesiados e foi-lhes induzida isquémia hepática por 30 minutos, tempo após o qual se iniciou a reperfusão. Não foi administrada qualquer formulação e foram sacrificados 24 h após a cirurgia. 4) Os animais do grupo designado por *SOD*, foram anestesiados, foi-lhes induzida isquémia hepática por 30 minutos, e administrou-se 200 µg de SOD livre, i.v., minutos antes de iniciar a reperfusão. Foram sacrificados 24 h após esta situação 5) Os animais do grupo *SODLip* foram anestesiados, foi-lhes induzida isquémia hepática por 30 minutos, e administrou-se 61 µg da formulação SOD-Lip, i.v., minutos antes de iniciar a reperfusão. Foram sacrificados 24 h após esta situação. 6) Os animais do grupo *SOD-Enzimo* foram anestesiados, foi-lhes induzida isquémia hepática por 30

minutos, e administrou-se 104,6 µg da formulação SOD-Enzimossomas, i.v., minutos antes de iniciar a reperfusão. Foram sacrificados 24 h após esta situação.

#### **4.3. Efeito das formulações administradas nos parâmetros em análise**

O efeito protetor das formulações administradas foi avaliado através da análise de diversos parâmetros 24 h após a isquémia/ reperfusão. Assim, para avaliar as lesões de I/R hepática, o sangue recolhido serviu de base para as análises bioquímicas da atividade de certas enzimas (no soro): AST, ALT, ALP e GGT, bem como para a obtenção do hemograma (plasma). Os fígados recolhidos seguiram para análise de anatomia patológica depois de preservados em solução de formalina, enquanto que os extratos proteicos hepáticos, nucleares e citosólicos, permitiram a análise dos níveis de NF-κB e IκBα por SDS-PAGE, seguido de *western-blot*.

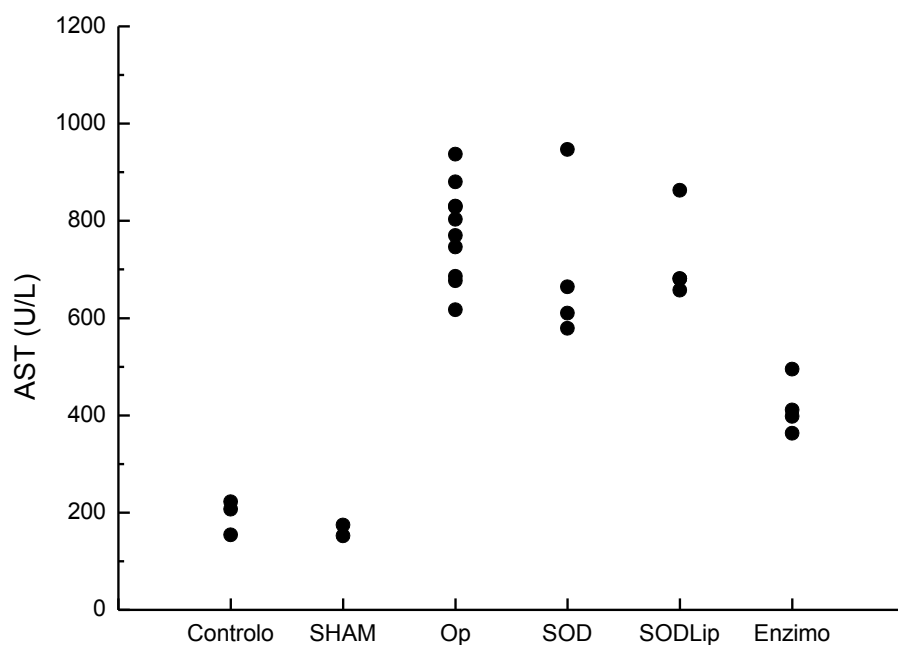
##### **4.3.1 Análises Bioquímicas**

Traumas musculares e cirurgias conduzem por si só a um aumento do AST no soro. Assim, quando encontrado no sangue, o AST é considerado um indicador sensível de lesões mitocondriais, especialmente em regiões hepáticas centri-lobulares que são particularmente sensíveis à lesão hepática por hipoxia ou por toxicidade.

Foram medidos os níveis de AST no soro dos diferentes grupos de animais. Através da análise da Figura 8, observa-se que há um aumento muito significativo nos níveis da actividade do AST dos animais Operados (800 U/L), relativamente ao grupo Controlo e SHAM (cerca de 200 U/L), os quais servem de valores de referência neste estudo. A administração de SOD (na forma livre) e de SOD-Lip provoca uma diminuição nos níveis do enzima (exceto num animal pertencente ao grupo SOD) para valores que rondam os 500 U/L. É no grupo dos animais administrados com Enzimossomas que esta diminuição é mais acentuada (400 U/L). De notar, no entanto que em nenhuma das administrações o valor de atividade de AST volta aos valores nos animais controlo.

De modo a confirmar os resultados obtidos no gráfico representado na figura 8, aplicou-se o teste estatístico *ANOVA fator único*, que permite comparar dois grupos independentes. Assim, pela análise da tabela 6 observa-se que a maior parte dos grupos comparados são diferentes entre si, excetuando o caso entre o grupo Controlo

e SHAM, entre o grupo Operado e os grupos SOD e SOD-Lip, e ainda entre o grupo SOD e SOD-Lip.



**Figura 8** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de AST no sangue de rato. Os animais sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.

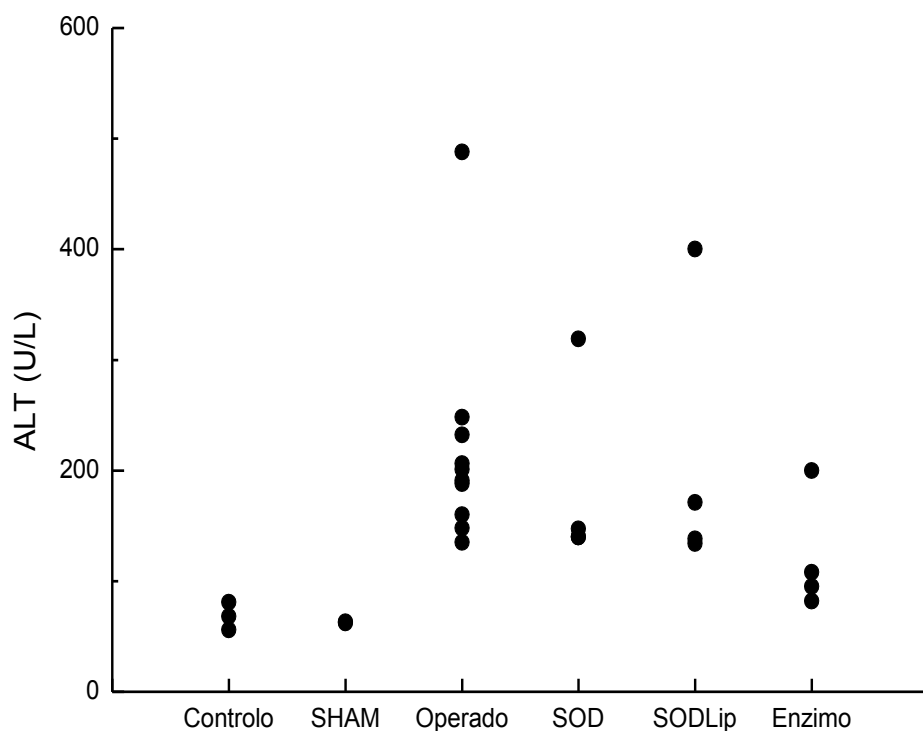
**Tabela 6-** Dados obtidos pelo teste *ANOVA fator único*: existência de diferença (≠) ou igualdade (=) entre os níveis de AST nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo). Os valores foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

	Controlo	SHAM	OP	SOD	SOD-Lip	SOD-Enzimo
Controlo		=	≠	≠	≠	≠
SHAM			≠	≠	≠	≠
OP				=	=	≠
SOD					=	≠
SOD-Lip						≠
SOD-Enzimo						

O ALT é o indicador mais importante em lesões hepatocelulares, sendo que a sua atividade se apresenta elevada dias após cirurgias abdominais e torácicas, e também após tratamento de algumas doenças. Observa-se na Figura 9 que ocorreu um ligeiro aumento nos níveis de actividade do ALT no grupo dos animais Operados (150/ 300 U/L) relativamente ao grupo Controlo e SHAM (100 U/L), à exceção de um animal deste grupo cujo valor da ALT está muito acima dos restantes. No grupo de animais em que foi administrada SOD “livre”, os valores (150 U/L) tendem a voltar aos valores do grupo Controlo e SHAM, à exceção também de um animal deste grupo, cujo valor se encontra mais elevado. Também no grupo SODLip há um valor acima de todos os outros, sendo que na maioria os valores de ALT diminuem quando comparados com o grupo Operado após administração desta formulação (150 U/L). O grupo dos animais aos quais foram administrados enzimosomas é o que apresenta valores de ALT mais próximos dos valores do Controlo e SHAM, rondando os 100 U/L.

Através desta análise conclui-se portanto, que é a formulação de enzimosomas que diminui os níveis de actividade de ALT que aumentam em animais operados não tratados (grupo Operado) para valores mais perto dos valores controlo (grupo Controlo e SHAM).

Os dados representados na figura 9 foram sujeitos a análise estatística (*ANOVA fator único*), a qual indica que os grupos comparados (tabela 7) apresentam semelhança nos níveis de ALT, exceto entre o grupo Controlo e o grupo Operado. Assim, as diferenças que se observam no gráfico da figura 9 podem-se considerar não estatisticamente significativas.



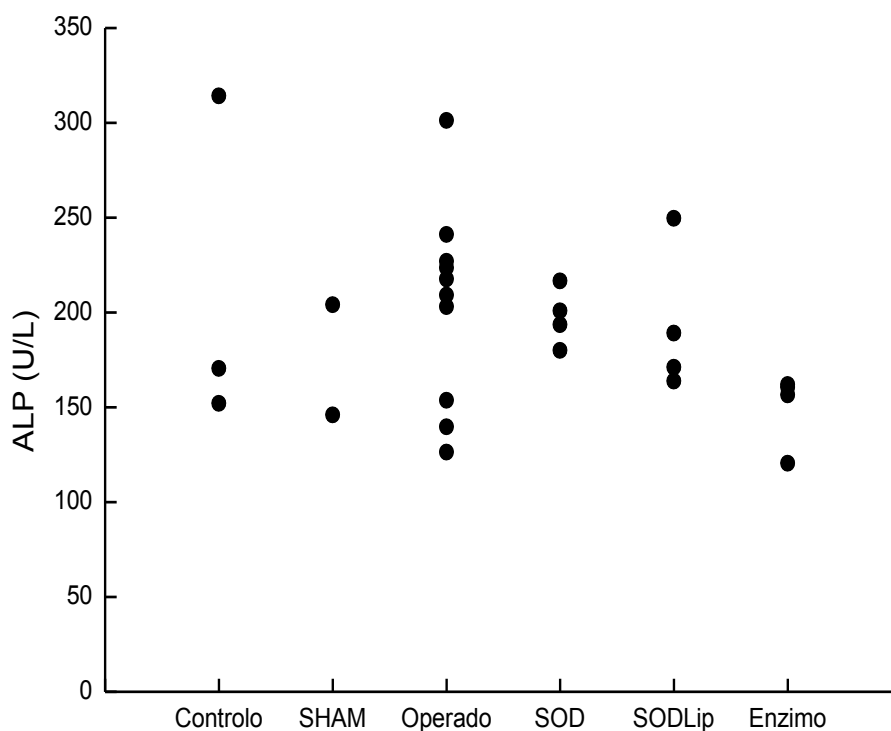
**Figura 9** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de ALT do sangue de rato. Os animais sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.

**Tabela 7-** Dados obtidos pelo teste *ANOVA fator único*: existência de diferença (≠) ou igualdade (=) entre os níveis de ALT nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo). Os valores foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

	Controlo	SHAM	OP	SOD	SOD-Lip	SOD-Enzimo
Controlo		=	≠	=	=	=
SHAM			=	=	=	=
OP				=	=	=
SOD					=	=
SOD-Lip						=
SOD-Enzimo						

A atividade do ALP é usada como biomarcador de doenças relacionadas com os órgãos de onde as diversas isoformas são provenientes. Observa-se um aumento nas concentrações das isoformas hepáticas deste enzima em doentes com vários tipos de distúrbios, nomeadamente em situações de isquémia [Gomez *et al*, 1995]. Pela análise da Figura 10, pode afirmar-se que os níveis de ALP nos grupos Controlo e SHAM são semelhantes, situando-se entre as 150/ 200 U/L, excetuando num dos animais do grupo Controlo que se situa acima destes valores. No grupo dos animais Operados, observa-se um pequeníssimo aumento dos níveis da ALP para valores de 250 U/L, sendo que também o grupo administrado com SOD “livre” apresenta estes valores. É então no grupo administrado com enzimosomas que se nota uma diminuição maior nos níveis de ALP, os quais tendem a descer para valores de 150 U/L, semelhantes aos níveis dos grupos Controlo e SHAM. Esta diminuição não é tão acentuada ao se administrar o SOD na forma lipossomal (200 U/L).

Assim, como nas situações anteriores é possível afirmar que é a formulação de enzimosomas que diminui os níveis de ALP para valores mais perto dos valores controlo (grupo Controlo e SHAM). Contudo, nas condições em que se trabalhou não se observaram diferenças muito significativas na atividade da ALP, fato confirmado pelos resultados da análise estatística apresentados na tabela 8.



**Figura 10** – Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de ALP do sangue de rato. Os animais sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.

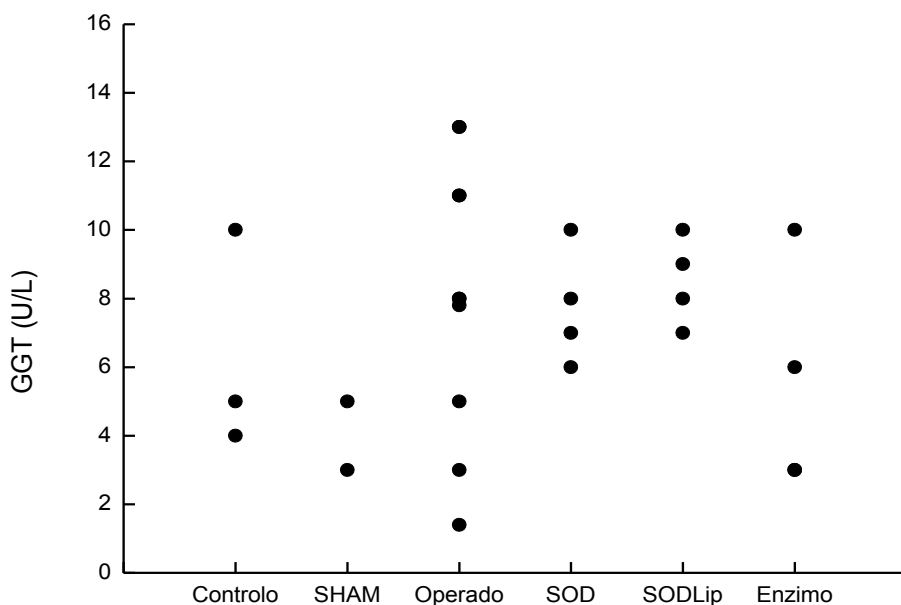
**Tabela 8-** Dados obtidos pelo teste *ANOVA fator único*: existência de diferença (≠) ou igualdade (=) entre os níveis de ALP nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo). Os valores foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

	Controlo	SHAM	OP	SOD	SOD-Lip	SOD-Enzimo
Controlo		=	=	=	=	=
SHAM			=	=	=	=
OP				=	=	=
SOD					=	≠
SOD-Lip						=
SOD-Enzimo						



Em situações normais, o GGT é secretado principalmente pelas células de Kupffer e pelas células endoteliais do ducto biliar, sendo que em fígado de rato, a elevada atividade da GGT observada no estágio fetal, diminui rapidamente à nascença, e é escassamente detetável em adultos [Jian *et al*, 2007].

Na figura 11, os valores para a atividade do GGT nos animais operados apresentam uma dispersão. Os níveis dos valores obtidos parecem ser baixos e deveria verificar-se um aumento na atividade do GGT nos grupos de animais com isquemia/reperfusão induzida, uma vez que perturbações fisiológicas como esta desviam os níveis para valores mais elevados. Por isso, nas condições em que se trabalhou não se observaram quaisquer diferenças significativas na atividade do GGT, uma vez que todos os valores se encontram dentro da gama de valores normais (<20 U/L). Assim, não é possível tirar qualquer conclusão sobre o efeito da operação na atividade do enzima ou sobre o tratamento com SOD, fato confirmado pela análise estatística apresentada na tabela 9, a qual não traduz diferenças nos níveis de GGT dos diferentes grupos em estudo.



**Figura 11** – Efeito da isquémia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de GGT do sangue de rato. Os animais sofreram isquémia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h. Controlo (n=3), SHAM (n=2), Operados (n=10), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=4). Ver doses de SOD administradas na tabela 5.

**Tabela 9-** Dados obtidos pelo teste *ANOVA fator único*: existência de diferença (≠) ou igualdade (=) entre os níveis de GGT nos vários grupos (Controlo, SHAM, Op, SOD, SOD-Lip e SOD-Enzimo). Os valores foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

	Controlo	SHAM	OP	SOD	SOD-Lip	SOD-Enzimo
Controlo		=	=	=	=	=
SHAM			=	=	≠	=
OP				=	=	=
SOD					=	=
SOD-Lip						=
SOD-Enzimo						

#### 4.3.2 Hemograma

O hemograma realizado às amostras de sangue dos diferentes grupos de animais permitiu obter dados acerca da contagem leucocitária, do estado do sistema imunitário do animal, e também da quantidade de hemoglobina.

Os valores de hemoglobina (resultados não mostrados) apresentam-se elevados, mas dentro do intervalo normal, em todos os grupos. Este fato permite afirmar que, nem a cirurgia nem a administração das duas formulações de SOD (SOD-Lip e Enzimo) bem como do SOD “livre”, provocaram anemias.

Quanto à inversão leucocitária, este é um parâmetro que permite saber, através de um hemograma, quando há ou não inflamação. Assim, considera-se que ocorreu inflamação quando se observa a ocorrência de inversão leucocitária, ou seja, quando a percentagem de neutrófilos é superior à percentagem de linfócitos. Esta linfopenia (diminuição de linfócitos) acompanhada de neutrofilia (aumento de neutrófilos) é característica de processos infecciosos de origem bacteriana, sendo muitas vezes também associado a situações fisiológicas de resposta a algum tipo de *stress* ou alteração.

**Tabela 10-** Efeito da isquemia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD na inversão leucocitária (I.L.) no sangue de rato. Os ratos sofreram isquemia durante 30 min e o sangue foi retirado após 24 h estando indicado para os diferentes grupos o número de animais que apresentaram inversão leucocitária (I.L.) e sem inversão leucocitária. Controlo (n=2), SHAM (n=2), Operados (n=9), SOD (administração de SOD “livre”) (n=4), SOD-Lip (administração de lipossomas de SOD) (n=4) e Enzimo (administração de enzimosomas de SOD) (n=3).

	Controlo	SHAM	OP	SOD	SOD-Lip	SOD-Enzimo
Nº de animais com I.L.	0	0	2	0	4	1
Nº de animais sem I.L.	2	2	7	4	0	2

Nos animais do grupo Controlo e SHAM não se observa inversão leucocitária (Tabela 10), logo não se desenvolveu nenhum processo inflamatório. Estes resultados vão de encontro ao esperado uma vez que nestes grupos, os animais não foram sujeitos a situações de isquemia/ reperfusão, evento que conduz a uma resposta inflamatória.

No grupo dos animais *Operados*, de entre os 9 animais estudados neste parâmetro, 7 não apresentam inversão leucocitária, sendo que apenas 2 foram afetados por este processo. Assim, assume-se que apenas em dois se desenvolveu uma resposta inflamatória estabilizada como consequência da isquemia e da reperfusão.

No grupo de animais a que se administrou *SOD* na forma livre, nenhum deles apresenta inversão leucocitária, indicando que nenhum dos animais desenvolveu uma resposta inflamatória, segundo estes dados.

Relativamente aos animais tratados com *SOD-Lip* todos eles apresentam inversão leucocitária, o que reflete que em todos ocorreu um processo inflamatório, como resposta aos danos oxidativos provocados pela situação de isquemia e reperfusão.

Dos animais tratados com enzimosomas, somente 3 serviram de base para o estudo imunológico, sendo que apenas 1 apresenta inversão leucocitária, ou seja, apenas este animal foi alvo de um processo inflamatório.

Devido à disparidade dos resultados obtidos na contagem leucocitária, considera-se que estes foram inconclusivos. Assim, esperar-se-ia que ocorresse inversão leucocitária nos animais dos grupos *Operados*, os quais desenvolveriam uma resposta inflamatória. No entanto, devido ao facto de os animais terem sido mortos 24 h após o processo cirúrgico é possível que não tivesse ainda ocorrido a inversão leucocitária. Nos grupos de animais administrados com *SOD*, *SOD-Lip* e *SOD-Enzimo*, esperava-se que o *stress* oxidativo, e consequentemente a inflamação, diminuíssem pela administração do SOD na forma livre, lipossomal e em enzimosomas. Nestes grupos, os animais não deveriam apresentar inversão leucocitária, fato observado em todos os animais do grupo *SOD-Lip*.

### 4.3.3 Anatomia patológica

O fígado é constituído por dois lobos principais, o direito e o esquerdo, e por dois lobos menores, o caudado e o quadrado. Os septos do tecido conjuntivo dividem o fígado em lóbulos que apresentam um sistema porta constituído por três vasos: veia porta hepática, artéria hepática e ducto hepático, sendo que os vários vasos que entram e saem do fígado confluem para o hilo hepático. Os sinusoides hepáticos são canais sanguíneos que existem entre os cordões hepáticos (compostos pelos hepatócitos). Estes canais são revestidos por um epitélio pavimentoso muito fino e irregular, composto por dois tipos de células: as células endoteliais, muito finas e dispersas, e as células de Kupffer (células fagocitárias) [Seeley *et al.*, 2003]. A veia centrolobular é o ramo inicial da veia hepática.

No estudo anátomo-patológico dos lóbulos hepáticos recolhidos, as características macroscópicas histológicas analisadas foram a congestão hepática, a dilatação da veia centrolobular bem como dos sinusóides, focos de necrose e infiltrados inflamatórios.

Para isso, os parâmetros referidos foram registados e quantificados de modo a permitir obter um diagnóstico acerca do estado do órgão (Tabela 11). Contudo, as diferenças entre os diferentes grupos de animais não são muito marcadas, sendo que as diferenças são subtis e os resultados próximos uns dos outros. Quanto à congestão hepática, relacionada com um aumento do volume do órgão, está presente em todos os grupos de animais exceto no animal do grupo controlo. A mesma situação se verifica para a dilatação da veia centrolobular (ramo inicial da veia porta). A dilatação dos sinusoides ocorreu em todos os grupos, sendo este evento caraterístico de

processos inflamatórios uma vez que estes canais são compostos pelas células de Kupffer as quais exercem a sua função fagocitária em situações de infeção e inflamação. Em nenhuma das amostras foram encontrados focos de necrose e apenas o animal do grupo controlo apresentou infiltrados inflamatórios ligeiros, que levam a um aumento da espessura do tecido devido à acumulação de leucócitos na zona. Desta forma, os resultados mostram-se inconclusivos e possivelmente ter-se-ia de esperar mais do que 24 horas para que estas diferenças fossem mais acentuadas.

**Tabela 11-** Efeito da isquémia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD em diversos parâmetros da anatomia patológica hepática. Foi feita a análise de 1 animal do grupo *Controlo*, 3 animais do grupo *Op* (Operados), 3 animais a que se administrou com *SOD* (SOD livre), 3 animais a que se administrou *SOD-Lip* (SOD lipossomal) e 3 animais a que se administrou *SOD-Enzimo* (enzimossomas com SOD). Situação normal (-), alterações mais ligeiras (+), alterações marcadas (++) , alterações mais marcadas (+++).

Animais	Congestão hepática	Dilatação da veia centrolobular	Dilatação dos sinusoides	Focos de necrose	Infiltrados inflamatórios
Controlo	-	-	-	-	+
Op 1	++	++	++	-	-
Op 2	++	++	+	-	-
Op 3	+	+	-	-	-
SOD 1	+++	++	+	-	-
SOD 2	+	++	+	-	-
SOD 3	++	++	+++	-	-
SOD-Lip 1	++	++	+	-	-
SOD-Lip 2	+	++	-	-	-
SOD-Lip 3	+	+	-	-	-
SOD-Enzimo 1	++	++	++	-	-
SOD-Enzimo 2	+	++	++	-	-
SOD-Enzimo 3	+	++	+	-	-

#### 4.3.4 SDS-PAGE e Western Blot

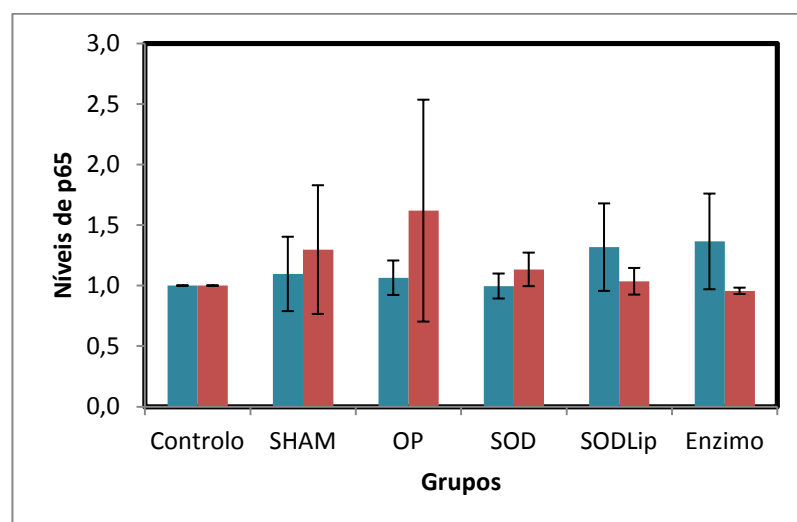
Os níveis de I $\kappa$ B $\alpha$  e NF- $\kappa$ B (p65), um dos principais reguladores da expressão de genes relacionados com o processo inflamatório durante a lesão de I/R hepática, foram quantificados por SDS-PAGE e Western Blot, usando anticorpos anti-p65 e anti-I $\kappa$ B. Mediu-se a translocação do p65 para o núcleo por western-blot, bem como a sua permanência no citosol. Os níveis de I $\kappa$ B $\alpha$  foram também quantificados. Para além disso, investigou-se ainda se a administração de SOD na forma “livre” ou em formulação (SOD-Lipossomal e SOD-Enzimossoma) consegue reduzir o processo inflamatório, atenuando o *stress* oxidativo, e impedir a activação e translocação do p65 para o núcleo.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de p65 citosólicos e nucleares, nos animais dos 6 grupos (Figura 12). No entanto, no caso dos níveis de p65 no citosol os animais operados parecem ter um maior nível de p65 quando comparados com os animais controlo e SHAM. Uma vez que se observou uma grande dispersão de valores será necessário confirmar este resultado. É possível, no entanto que 30 minutos de isquémia não tenha sido tempo suficiente para que ocorresse ativação do p65, ou que 24h após a reperusão tenha sido demasiado tempo para a recolha e análise das amostras de sangue e fígado. A favor desta última hipótese existem dados na literatura em que se determinou a ativação do NF- $\kappa$ B ao longo do tempo após transplante hepático [Xiao-Ping Gu, *et al.*, 2004], e onde se observou que a ativação do NF- $\kappa$ B aumenta ligeiramente 30 minutos após a reperusão e marcadamente 1 h após a reperusão, atingindo o seu máximo 2 h após a reperusão. Num outro estudo [Ricciardi *et al.*, 2000], os investigadores obtiveram dois picos distintos de maior expressão do NF- $\kappa$ B: durante a isquémia a frio (45 minutos após isquémia) e 180 minutos após a reperusão.

Existe ainda outro fator que limita a análise dos dados obtidos, o qual reside no fato de o número de amostras analisadas por *Western-blot* ter sido reduzido, e de existirem desvios padrão muito grandes, como no caso do grupo dos animais Operados (Figura 12c).

a)

b)



c)

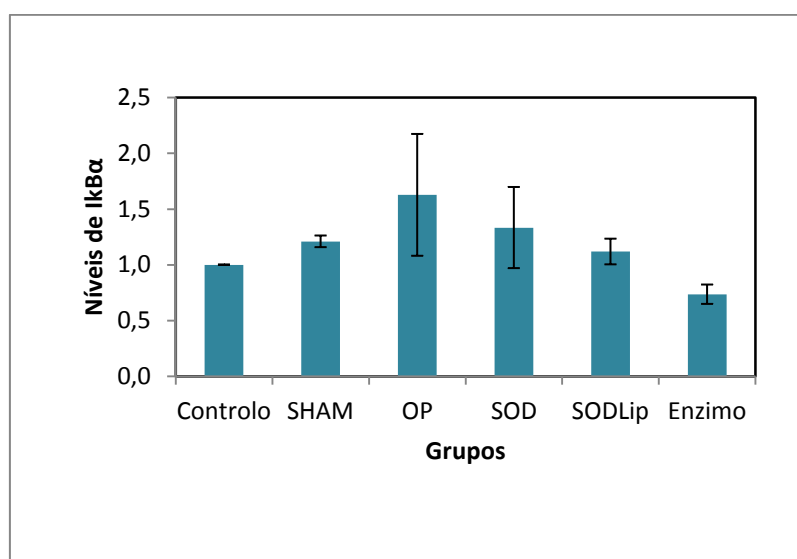
**Figura 12** – Efeito da isquémia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de p65 no fígado de rato, determinados por Western blot. Níveis do p65 no citosol (a) e no núcleo (b) e quantificação dos níveis de p65 no citosol e núcleo (c) a partir de nove amostras de extratos proteicos de homogenatos hepáticos. 1- Controlo; 2-SHAM; 3- Operado; 4 e 5- SOD; 6 e 7- SODLip; 8 e 9- SOD-Enzimo. p65 no citosol (cor vermelha) e no núcleo (cor azul) (c). A quantificação foi feita através do *software ImageJ* e estão indicados a média  $\pm$  SD.

No que diz respeito aos níveis do  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  no citosol (Figura 13a) e 13c)), observa-se um acentuado aumento nos animais *Operados* em relação aos grupos *Controlo* e *SHAM*. Contudo, nos grupos administrados com SOD ocorreu uma diminuição dos níveis de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  citosólicos, sendo que esta diminuição é mais acentuada no grupo de animais tratados com enzimosomas. Assim, e segundo a análise estatística com recurso ao teste *ANOVA fator único*, apenas entre o grupo Operado e o grupo administrado com enzimosomas se observa uma alteração significativa nos níveis de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  citosólico, o

qual diminui no grupo tratado. Estes resultados mostram-se no entanto inconclusivos, e pode afirmar-se que seria necessário analisar um maior número de amostras por *Western-blot*, para se verificarem as possíveis diferenças que possam existir no que diz respeito aos níveis de  $I\kappa B\alpha$ .

a)

b)



c)

**Figura 13-** Efeito da isquémia/reperfusão e do tratamento com diversas formulações de SOD nos níveis de  $I\kappa B\alpha$  no fígado de rato, determinados por Western blot. Níveis  $I\kappa B\alpha$  no citosol (a) e no núcleo (b) e quantificação dos níveis de  $I\kappa B\alpha$  citosólicos (c) a partir de nove amostras de extratos proteicos de homogenatos hepáticos. 1- Controlo; 2-SHAM; 3- Operado; 4 e 5- SOD; 6 e 7- SODLip; 8 e 9- SOD-Enzimo. A quantificação foi feita através do *software ImageJ* e estão indicados a média  $\pm$  SD.





## 5. Conclusões

---



Considera-se que a lesão de isquemia/reperfusão (I/R) hepática é um processo multifatorial que altera o funcionamento do fígado após um transplante, de forma que é necessário compreender os eventos bioquímicos por de trás desta situação para que se possam desenvolver estratégias terapêuticas que aumentem o sucesso na área do transplante hepático. A lesão de I/R resulta numa resposta inflamatória aguda, determinada pelo balanço entre mediadores pró- e anti-inflamatórios, sendo o *stress* oxidativo um fator importante no desenvolvimento desta condição patológica.

A única estratégia estabelecida para limitar a lesão de IR é a reperfusão precoce do tecido isquémico. Contudo, muitos agentes antioxidantes que apresentam diferentes mecanismos de ação, têm sido experimentados na proteção do fígado na lesão de isquemia/reperfusão, tanto em estudos laboratoriais como clínicos. Assim, de modo a desintoxicar eficazmente as ROS intracelulares, desenvolveu-se este estudo que assenta na administração de SOD incorporada num sistema vetor de transporte.

Os lipossomas como transportadores de fármacos sofreram algumas alterações desde o início da sua utilização, tentando-se melhorar a estrutura básica para aumentar as suas aplicações terapêuticas. Assim, conseguiram-se obter vesículas de longo tempo de circulação e de pequeno tamanho, as quais apresentam um papel importante na entrega de fármacos a certos tecidos, nomeadamente em locais de inflamação. A sua camada hidrofílica superficial inibe o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, nomeadamente as células de Kupffer no fígado e no baço.

Os principais problemas com a administração de SOD são o seu curto tempo de meia vida na circulação (cerca de 6 min), e a falta de internalização da proteína intacta para o interior das células (baixa biodisponibilidade). Assim, de forma a melhorar a disponibilidade de SOD intracelular, desenvolveram-se derivados peguilados que facilitam a sua internalização para as células não parenquimatosas do fígado. As células de Kupffer e as células do endotélio sinusoidal apresentam recetores que reconhecem e internalizam ligandos contendo proteínas peguiladas, e é por isso que os derivados de SOD direcionados demonstram efeitos benéficos na prevenção da lesão de I/R hepática.

Nas vesículas lipídicas, os enzimas podem estar associados à superfície dos lipossomas formando uma partícula a qual se denomina enzimosossoma, que se define como sendo um lipossomas que expressa atividade catalítica na sua forma intacta, ou seja, antes da rutura da vesícula.

Neste estudo a eficácia de incorporação da proteína na vesícula lipídica varia dos lipossomas para os enzimosomas, sendo que nesta última formulação este parâmetro aumenta de 9 para 25%, valores influenciados pelo método de preparação das partículas.

Sendo o tamanho um fator determinante no sucesso de entrega do fármaco ao seu local alvo, obtiveram-se partículas com tamanho médio  $\leq 0,15 \mu\text{m}$  para ambas as formulações.

Nos estudos *in vivo* os animais estiveram com isquemia induzida durante 30 minutos, e as amostras de sangue e fígado recolhidas 24h após a cirurgia, permitiram a análise da atividade de vários enzimas hepáticos (AST, ALT, ALP e GGT). A atividade da AST foi a que mais alterou com a isquemia e com a administração das formulações. Quanto à inversão leucocitária e à análise patológica foram ambas inconclusivas.

No ponto de estudo em que se analisaram os extratos proteicos hepáticos correspondentes quer à fração nuclear, quer à fração citosólica, por SDS-PAGE seguido de *western-blot*, não se observaram diferenças significativas nos níveis de ativação de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B $\alpha$ . Para isso ter-se-ia de aumentar o número de amostras analisadas, bem como alterar os tempos de isquemia e de recolha das amostras de fígado.

De um modo geral, pode afirmar-se que o objetivo principal deste trabalho experimental foi atingido, uma vez que se conseguiram obter enzimosomas de SOD como forma de tratamento para lesões inflamatórias provocadas pelo *stress* oxidativo despoletado pela isquemia/reperfusão hepática.

## 6. Perspetivas Futuras

---



No seguimento deste trabalho, e tendo-se concluído que os enzimosomas de SOD atuam com sucesso na diminuição do *stress oxidativo* resultante da inflamação originada pela isquémia/reperfusão hepática, seria interessante aumentar a atividade terapêutica do SOD, após administração intravenosa, otimizando o esquema de tratamento (diferentes doses, tempo de administração). Seria igualmente importante que a análise do tratamento fosse feita a tempos diferentes consoante o parâmetro analisado.

Seria igualmente interessante aumentar o número de amostras na análise por Western-blot, de modo a retirar conclusões sólidas acerca da alteração nos níveis de NF- $\kappa$ B, para verificar se a formulação de enzimosomas de SOD diminui a sua ativação e a consequente expressão de genes pró-inflamatórios.





## 7. Bibliografia

---



- Amacher, D.E. (1998) "Serum Transaminase Elevations as Indicators of Hepatic Injury Following the Administration of Drugs", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **27**, 119-130
- Amersi, F., Farmer, D.G., Shaw, G.D., Kato, H., Coito, A.J., Kaldas, F. *et al* (2002) "P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury" *Am J Transplant* **2**: 600-8.
- Amersi, F., Nelson, S.K., Shen, X.D., *et al* (2002) "Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury" *Proc Natl Acad Sci*, **99**: 8915.
- Armogiga *et al* (2012) "Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia", *British Journal of Pharmacology*, **166**: 1211–1224.
- Arnault, T., Michiels, C., Alexandre, I., Remacle, J. (1992) "Effects of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells" *J Cell Physiol* **152**: 215-21.
- Artiss, J. D., Vinogradov, S., Zak, B. (1981) "Spectrophotometric study of several sensitive reagentes for sérum iron", *Clin Biochem*, **14**: 311-315.
- Bangham, A. D. e Horne, R. W. (1964), *Journal Molecular Biology*, **8**, 660–668.
- Barnes, P. J., D.M, D.Sc e Karin, M., PH.D. (1997) "Nuclear Factor-  $\kappa$ B- A Pivotal transcriptional factor In Chronic inflammatory diseases", *The New England Journal of Medicine*, **336**, Nr.º 15, 1066-1070.
- Batista, C. M., Carvalho, C. M. B. e Magalhães, N. S. S. (2007) "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte", *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **43**, Nr.º 2.
- Bergmeyer, H.U., Scheibe, P. and Wahlefeld, A .W. (1978) "Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase" *Clinical Chemistry January*, **vol. 24** nr. 1, 58-73.
- Betteridge, D.J. (2000) "What is oxidative stress?" *Metabolism*, **49**: 3-8.
- Bilzer, M. e Gerbes, A. L., (2000) "Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies", *Journal of Hepatology*, **32**, 508-515.

Birlouez-Aragon, I., Tessier, F.J. (2003) "Antioxidant vitamins and degenerative pathologies. A review of vitamin C" *J Nutr Health Aging*, **7**:103-109.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., *et al.* (1997) "A metalloproteinase disintegrin that releases tumournecrosis factor-alpha from cells" *Nature*; **385**: 729-33.

Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C. (1991) "Macrophage deactivation by interleukin 10" *J Exp Med*, **174**(6): 1549-55.

Bordewick, U., Heese, M., Borchers, T., *et al* (1989) "Compartmentation of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis" *Biol Chem Hoppe Seyler*, **370**:229.

Churchill, T.A., Cheetham, K.M., Fuller, B.J. (1994) "Glycolysis and energy metabolism in rat liver during warm and cold ischemia: Evidence of an activation of the regulatory enzyme phosphofructokinase" *Cryobiology*; **31**: 441-452.

Colletti, L.M., Cortis, A., Lukacs, N., Kunkel, S.L., Green, M., Strieter, R.M. (1998) "Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat" *Shock*; **10**: 182-91.

Colletti, L.M., Remick, D.G., Burtch, G.D., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Campbell, D.A. Jr. (1990) "Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat" *J Clin Invest* ; **85**: 1936-43.

Corvo, M. L, Boerman, O. C., Oyen, W. J. G., Bloois, L.V., Cruz, M. E. M., Crommelin, D. J. A. e Storm, G. (1999) "Intravenous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes II. In vivo fate in a rat model of adjuvant arthritis", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1419**, 325-334.

Corvo, M. L. (1998) "Liposomes as Delivery System for Superoxide Dismutase in Experimental Arthritis".

Cotgreave, I.A. (1997) "N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications" *Adv Pharmacol* **38**: 205.

- Cruz, M. E. M., Simões, S. I., Corvo, M. L., Martins, M. B. F. e Gaspar, M. M. (2009) "Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Formulation and Characterization".
- Dhar, D.K., Takemoto, Y., Nagasue, N., Uchida, M., Ono, T., Nakamura, T. (1996) "FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia- reperfusion injury of the canine liver" *J Surg Res*, **60**: 142-146.
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., Karin, M. A. (1997) "Cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB" *Nature*; **388**: 548-54.
- Dorman, R.B., Gujral, J.S., Bajt, M.L., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2005) "Generation and functional significance of CXC chemokines for neutrophilinduced liver injury during endotoxemia" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**: G880–G886.
- Ek-Von Mentzer, B.A., Zhang, F., Hamilton, J.A. (2001) "Binding of 13-hode and 15-hete to phospholipid bilayers, albumin, and intracellular fatty acid binding proteins, implications for transmembrane and intracellular transport and for protection from lipid peroxidation" *J Biol Chem*, **276**: 15575.
- El-Benna, J., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A., and Elbim, C. (2005) "Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses" *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**: 199–206.
- Farhood, A., McGuire, G.M., Manning, A.M., Miyasaka, M., Smith, C.W., Jaeschke, H. (1995) "Intercellular adhesion molecule1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver" *J Leukoc Biol*; **57**: 368-374.
- Faurschou, M. and Borregaard, N. (2003) "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation" *Microbes Infect* ; **5**: 1317–1327.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A. (1991) "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages" *J Immunol*; **147(11)**: 3815-22.
- Franco-Gou, R., Rosello-Catafau, J., Casillas-Ramirez, A., *et al* (2006) "How ischaemic preconditioning protects small liver grafts" *J Pathol*, **62**: 2081.

Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., Entman, M.L. (2002) "The inflammatory response in myocardial infarction" *Cardiovasc Res*; **53**: 31-47.

Fusai, G., Glantzounis, G.K., Hafez, T., *et al* (2005) "N-Acetylcysteine ameliorates the late phase of liver ischaemia/reperfusion injury in the rabbit with hepatic steatosis" *Clin Sci (Lond)* **1095**:465.

Gasbarrini, A., Borle, A.B., Farghali, H., Bender, C., Francavilla, A., Van Thiel, D. (1992) "Effect of anoxia on intracellular ATP, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and cytotoxicity in rat hepatocytes" *J Biol Chem*; **267**.

Gaspar, M. M., Boerman, O. C., Laverman, P., Corvo, M. L., Storm, G. e Cruz, M. E. M. (2007) "Enzymosomes with surface-exposed superoxide dismutase: In vivo behaviour and therapeutic activity in a model of adjuvant arthritis", *Journal of Controlled Release*, **117**, 186-195.

Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. (1998) "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses" *Annu Rev Immunol*; **16**: 225-60.

Glantzounis, G. K., Salacinski, H. J., Yang, W., Davidson, B. R. e Seifalian, A. M. (2005) " The Contemporary Role of Antioxidant Therapy in Attenuating Liver Ischemia-Reperfusion Injury: A Review", *Liver Transplantation*, **11**, Nr.º 9, 1031-1047.

Gomez, B., Jr., Ardakani, S., Ju, J., Jenkins, D., Cerelli, M. J., Daniloff, G. Y. e Kung, V. T. (1995) "Monoclonal Antibody Assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum", *Clinical Chemistry*, **41**, Nr.º 11, 1560-1566.

Gonzalez-Flecha, B., Cutrin, J.C., Boveris, A. (1993) "Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion" *J Clin Invest*; **91**:456-464.

Granger, D.N., Kubes, P. (1994) "The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion" *JLeukoc Biol* **555**:662.

Gu, X., Qiu, Y., Xu, F., Jiang, Y., Ding, Y. (2004) "In vivo suppressive effect of nuclear factor – kB inhibitor on neutrophilic inflammation of grafts after orthotopic liver transplantation in rats", *World J Gastroenterol*, **10**, Nrº 24, 3654-3658.

Gujral, J. S., Hinson, J. A., Farhood A., e Jaeschke, H. (2004) "NADPH oxidase derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **287**, 243-252.

Gujral, J.S., Farhood, A., Bajt, M.L., and Jaeschke, H. (2003) "Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice" *Hepatology* **38**: 355–363.

Gutteridge, J.M. (1995) "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage" *Clin Chem*; **41**: 1819-1828.

Halliwell,B., Gutteridge, J.M. (1990) "The antioxidants of human extracellular fluids" *Arch Biochem Biophys*; **280**:1-8.

Ho, J.S., Buchweitz, J.P., Roth, R.A., and Ganey, P.E. (1996) "Identification of factors from rat neutrophils responsible for cytotoxicity to isolated hepatocytes" *J Leukoc Biol* **59**: 716–724.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1993) "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages" *Science*; **260(5107)**: 547-9.

Husted, T. L. e Lentsch, A. B. (2006) "The Role of Cytokines in Pharmacological Modulation of Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury", *Current Pharmaceutical Design*, **12**, 2867-2873.

Harada, N., Iimuro, Y., Nitta, T., et al (2003) "Inactivation of the small GTPase Rac1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury in the rat" *Surgery* **1343**:480.

Hasegawa, T., Malle, E., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2005) "Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemiareperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G760–G767.

Hasegawa, T., Malle, E., Farhood, A., et al (2005) "Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemiareperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*



Hassan, L., Bueno, P., Ferron-Celma, I., *et al* (2005) "Time course of antioxidant enzyme activities in liver transplant recipients" *Transplant Proc* **37**:3932.

limuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K.E., Schoonhoven, R., Grisham, J.W., *et al.* (1998) "NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration" *Journal Clinical Investigation*, **101**:802-811.

Jaeschke, H. (2000) "Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury" *J Gastroenterol Hepatol* **15**: 718–724.

Jaeschke, H. (2003) "Molecular mechanisms of hepatic ischemiareperfusion injury and preconditioning" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; **284**(1): G15-26.

Jaeschke, H. (2006) "Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290**, 1083-1088.

Jaeschke, H. and Smith, C.W.(1997) "Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury" *J Leukoc Biol* **61**: 647–653.

Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A.P., Spolarics, Z., Spitzer, J.J., Smith, C.W. (1993) "Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver" *HEPATOLOGY*; **17**:915-923.

Jaeschke, H., Fisher, M.A., Lawson, J.A., Simmons, C.A., Farhood, A., and Jones, D.A.(1998) "Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model" *J Immunol* **160**: 3480–3486.

Jaeschke, H., Ho, Y.S., Fisher, M.A., Lawson, J.A., and Farhood, A. (1999) "Glutathione peroxidase deficient mice are more susceptible to neutrophilmediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress" *Hepatology* **29**: 443–450.

- Jian, W., Nianyue, W., Zhiqiang, C., Yinwei, W., Wei, Z. e Zheng, F. (2007) "A Simple and Specific Method for Detection of Hepatoma Specific GGT by Affinity Chromatography, *Science*, **38**, Nr° 3, 160-164.
- Karmen, A., Wroblewski, F., Ladue, J.S. (1955) "Transaminase activity in human blood" *J Clin Invest.*; **34(1)**:126–131.
- Kato, A., Okaya, T., Lentsch, A.B. (2003) "Endogenous IL-13 protects hepatocytes and vascular endothelial cells during ischemia/reperfusion injury", *Hepatology*, **37**: 304-12.
- Kato, A., Okaya, T., Lentsch, A.B. (2003) "Endogenous IL-13 protects hepatocytes and vascular endothelial cells during ischemia/reperfusion injury" *Hepatology*; **37**: 304-12.
- Kishimoto, T.K., Larson, R.S., Corbi, A.L., Dustin, M.L., Staunton, D.E., Springer, T.A. (1989) "The leukocyte integrins" *Adv Immunol*; **46**: 149-82.
- Kita, Y., Iwaki, Y., Demetris, A., Starzl, T. (1994) "Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients" *Transplantation*; **57**: 1037-41.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., *et al.* (1989) "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes" *J Exp Med*; **170(3)**: 827-45.
- Kohli, V., Gao, W., Camargo, C.A., Clavien, P.A. (1997) "Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation" *Proc Natl Acad Sci USA*; **94**: 9354-9.
- Kohli, V., Madden, J.F., Bentley, R.C., Clavien, P.A. (1999) "Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis" *Gastroenterology*; **116**: 168-78.
- Kupiec-Weglinski, J.W. e Busuttil, R.W. (2005) "Ischemia and Reperfusion Injury in Liver Transplantation", *Transplantation Proceedings*, **37**, 1653–1656.
- Laubach, V. E., French, B. A. e Okusa, M. D. (2011) "Targeting of adenosine receptors in ischemia - reperfusion injury", *Expert Opinion. Ther. Targets*, **15**, 103-118.

Lehmann, T.G., Wheeler, M.D., Froh, M., Schwabe, R.F., Bunzendahl, H., Samulski, R.J., *et al.* (2003) "Effects of three superoxide dismutase genes delivered with an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat" *Transplantation*, **76**: 28-37.

Lehmann, T.G., Wheeler, M.D., Schoonhoven, R., Bunzendahl, H., Samulski, R.J., Thurman, R.G. (2000) "Delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase genes with a viral vector minimizes liver injury and improves survival after liver transplantation in the rat" *Transplantation*, **69**:1051-1057.

Lentsch, A. B., Yoshidome, H., Warner, R. L., Ward, P. A., Edwards, M. J. (1999) "Secretory leukocyte protease inhibitor in mice regulates local and remote organ inflammatory injury induced by hepatic ischemia/reperfusion", *Gastroenterology*, **117**, Nr° 4, 953-961.

Lentsch, A.B., Kato, A., Yoshidome, H., McMasters, K. M. e Edwards, M.J. (2000) "Inflammatory Mechanisms and Therapeutic Strategies for Warm Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury", *Hepatology*, **32**, Nr. ° 2, 169-172.

Lentsch, A.B., Shanley, T.P., Sarma, V., Ward, P.A. (1997) "*In vivo* suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin- 10 and interleukin-13" *J Clin Invest* ; **100**(10): 2443-8.

Lentsch, A.B., Yoshidome, H., Cheadle, W.G., Miller, F.N., Edwards, M.J. (1998) "Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC" *Hepatology*; **27**(4): 1172-7.

Lentsch, A.B., Yoshidome, H., Kato, A., Warner, R.L., Chaedle, W.G., Ward, P.A., *et al.* (1999) "Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice" *Hepatology*; **30**(6): 1448-1453.

Leutner , S., Schindowski, K., Frolich, L., *et al* (2005) "Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients" *Pharmacopsychiatry* **386**: 312.

Liu, W., Schob, O., Pugmire, J. E., Jackson, D., Zucker, K. A., Fry, D. E. e Glew, R. H. (1996) "Glycohydrolases as Markers of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Recovery", *Hepatology*, **24**, 157-162.

Loftis, L.L., Johanns, C.A., Lechner, A.J., *et al* (2000) "Brief hypoxic stress suppresses postbacteremic NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  bioactivity in perfused liver" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**:R99.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. & Randall, R. J. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent" *J. Biol. Chem.* **193**:265.

Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., *et al.* (1993) "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells" *J Exp Med*; **177**(4): 1199-204.

McCurry, K.R., Campbell, D.A. Jr, Scales, W.E., Warren, J.S., Remick, D.G. (1993) "Tumor necrosis factor, interleukin 6, and the acute phase response following hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res*; **55**(1): 49-54.

Mochida, S., Arai, M., Ohno, A., Masaki, N., Ogata, I., Fujiwara, K. (1994) "Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats", *Liver*, **14**: 234-240.

Moncada, S., Higgs, A.(1993) "The L-arginine-nitric oxide pathway", *N Engl J Med*; **329**:2002-2012.

Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D. (1995) "Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse" *Cell* **83**: 473.

Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L.,*et al.* (1997) "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ " *Nature*; **385**: 733-6.

Myers, K.J., Eppihimer, M.J., Hall, L., Wolitzky, B. (1998) "Interleukin-12- induced adhesion molecule expression in murine liver" *Am J Pathol*; **152**(2): 457-68.

Nagendra, A.R., Mickelson, J.K., Smith, C.W. (1997) "CD18 integrin and CD54-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated human hepatocytes" *Am J Physiol* **272**:408, 1997

Nichols, J.C., Bronk, S.F., Mellgren, R.L., Gores, J.G. (1994) "Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes" *Gastroenterology*; **106**: 168-76.

Noack, K., Bronk, S.F., Kato, A., Gores, G.J. (1993) "The greater vulnerability of the bile duct cells to reoxygenation injury than anoxia. Implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation" *Transplantation*; **56**: 495-500.

Nordstrom, G., Saljo, A., Hasselgren, P.O., (1988) "Studies on the possible role of oxygen-derived free radicals for impairment of protein and energy metabolism in liver ischemia" *Circ Shock*, **26**: 115-126.

Okaya, T. and Lentsch, A.B. (2003) "Cytokine cascades and the hepatic inflammatory response to ischemia and reperfusion" *J Invest Surg* **16**: 141–147.

Oreopoulos, G.D., Wu Heshui, Szaszi, K., Fan, J., Marshall, J.C., Khadaroo, R.G., *et al.* (2004) "Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: a role for interleukin- 10" *Hepatology*; **40**: 211-20.

Ozaki, M., Deshpande, S.S., Angkeow, P., *et al* (2000) "Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in vivo" *FASEB J* **14**:418.

Ozturk, H., Gezici, A., Ozturk, H.(2006) "The effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on liver ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats" *Hepatol Res* **342**: 76.

Palma-Vargas, J.M., Toledo-Pereyra, L., Dean, R.E., Harkema, J.M., Dixon, R.A., Kogan, T.P. (1997) "Small-molecule selectin inhibitor protects against liver inflammatory response after ischemia and reperfusion" *J Am Coll Surg*; **185(4)**: 365-72.

- Perkins, N.D., Schmid, R.M., Duckett, C.S., Leung, K., Rice, N.R., Nabel, G. (1992) "Distinct combinationns of NF-kappa B subunits determine the specificity of transcriptional activation" *Proc Natl Acad Sci USA*; **89**: 1529-33.
- Quarfordt, S. H., Callery, M. P., Chari, R. S. and Meyers, W. C. (2000) "NFkB Expression during Cold Ischemia Correlates with Postreperfusion Graft Function", *Journal of Surgical Research*, **93**: 35–40.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, (<http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.).
- Ricciardi, R., Kim, R.D., McDade, T. P., Perugini, R. A., Veal, T. M, Rodriguez-Reynoso, S., Leal, C., Portilla, E., Olivares, N., Muniz, J. (2001) "Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: Possible role of tumor necrosis factoralpha and nitric oxide" *J Surg Res*; **100**:141-149.
- Rouser, G., Fleischer, S. e Yamamoto, A. (1969) "Two Dimensional Thin Layer Cromatographic Separation of polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spot", *Short Communications*, **5**, Nr.º 5, 494-496.
- Saido, T.C., Sorimachi, H., Suzuki, K. (1994) "Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement" *FASEB J*; **8**: 814-22.
- Schemmer, P., Bradford, B.U., Rose, M.L., Bunzendahl, H., Raleigh, J.A., Lemasters, J.J., *et al.* (1999) "Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation" *Am J Physiol*; **276**: G924-32.
- Schmidt, H.H., Lohmann, S.M., Walter, U. (1993) "The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action" *Biochim Biophys Acta*; **1178**:153-175.
- Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B., Baldwin, A.S. Jr. (1999) "Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding" *J Biol Chem*; **274**(45): 31868-74.
- Seekamp, A., Warren, J.S., Remick, D.G., Till, G.O., Ward, P.A. (1993) "Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury" *Am J Pathol* ; **143**: 453-63.

- Seeley, R.R, Stephens, T. D., Tate, P. (2003) "Anatomia e Fisiologia, 6<sup>ed</sup>", 898-902
- Šegota, S. e Težak, D. (2006) "Spontaneous formation of vesicles", *Advances in Colloid and Interface Science*, **121**, 51–75.
- Shaw, L.M., London, J.W., Fetterolf, D., Garfinkel, D. (1977) "Gamma-Glutamyltransferase: kinetic properties and assay conditions when gamma-glutamyl-4-nitroanilide and its 3-carboxy derivative are used as donor substrates" *Clinical Chemistry* **vol. 23 (1)** 79-85.
- Siedel, J. (1984) "Improved Ferrozine based reagent for the determination of serum iron (transferrin iron) without deproteiniization", *Clin Chem.*, **30**, 975.
- Sindram, D., Porte, R.J., Hoffman, M.R., Bentley, R.C., Clavien, P.A.(2000) "Platelets induced sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver" *Gastroenterology* ;**118**:183-191.
- Singh, I., Zibari, G.B., Brown, M.F., Granger, D.N., Eppihimer, M., Zizzi, H., Cruz, L., *et al.* (1999) "Role of P-selectin expression in hepatic ischemia and reperfusion injury" *Clin Transplant* **13**:76-82.
- Sivaraman, T., Kumar, T. K. S., Jayaraman, G. e Yu, C. (1997) "The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation", *Journal of Protein Chemistry*, **16**, Nr.º4, 291-297.
- Soenen, S. J., Velde, G. V., Ketkar-Atre, A., Himmelreich, U. e Cuyper, M.D. (2011) "Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents", *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **3**.
- Svetlov, S.I., Xiang, Y., Oli, M. W., Foley, D. P., Huang, G., Hayes, R.L., Ottens, A.K. e Wang, K. K. W. (2006) "Identification and preliminary validation of novel biomarkers of acute hepatic ischaemia/reperfusion injury using dual-platform proteomic/degradomic approaches", *Biomarker*, **11**, 355-369.
- Tanaka, J., Malchesky, P.S., Omokawa, S., Goldcamp, J.B., Harasaki, H., Vogt, D.P., *et al.* (1990) "Effects of prostaglandin I2, superoxide dismutase, and catalase on ischemia-reperfusion injury in liver transplantation" *ASAIO Trans*, **36**: M600–M603.

Thompson, K., Maltby, J., Fallowfield, J., McAulay, M., Millward- Sadler, H., Sheron, N. (1998) "Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis" *Hepatology*, **28(6)**: 1597-606.

Tietz, N. W. (1980) "Progress in the development of a recommended method for alkaline phosphatase activity measurements", *Clinical Chemistry*, **26**, 1023.

Tomee, J.F., Koeter, G.H., Hiemstra. P.S., Kauffman, H.F. (1998) "Secretory leukoprotease inhibitor: a native antimicrobial protein presenting a new therapeutic option?" *Thorax*; **53(2)**: 114-6.

Torchilin, V. P. (2005) "Recent Advances With Liposomes as Pharmaceutical Carriers", *Nature*, **4**, 145-160.

Trinchieri G. (2003) "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity" *Nat Rev* ; **3**: 133-146.

Tsung, A., Hoffman, R. A., Izuishi, K., Critchlow, N. D., Nakao, A., Chan, M. H., Lotze, M. T., Geller, D. A. e Billiar, T. R. (2005) "Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury Involves Functional TLR4 Signaling in Nonparenchymal Cells", *J Immunol*, **175**, 7661-7668.

Tsung, A., Sahai, R., Tanaka, H., Nakao, A., Fink, M.P., Lotze, M.T., Yang, H., Li, J., Tracey, K.J., Geller, D.A., and Billiar, T.R. (2005b) "The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion" *J Exp Med* **201**: 1135–1143.

Vale, C.A., Corvo, M.L., Martins, L.C.D., Marques, C.R., Storm, G. Cruz, M.E.M., Martins, M.B.F.(2006) "Construction of enzymosomes: Optimization of coupling parameters" *NSTI-Nanotech*, **2**: 396-397.

Van Snick J (1990) "Interleukin-6: an overview" *Annu Rev Immunol*; **8**: 253-78.



Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B.S., Karoui, H., *et al.* (1998) "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors" *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95**:9220-9225.

Vollmar, B., Glasz, J., Leiderer, R., Post, S. e Menger, M. D. (1994) "Hepatic Microcirculatory Perfusion Failure Is a Determinant of Liver Dysfunction in Warm Ischemia-Reperfusion", *American Journal of Pathology*, **145**, Nr. ° 6, 1421-1430.

Waage , A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T. (1989) "The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock" *J Exp Med*; **169**: 333-8.

Wahl, S.M., McNeely, T.B., Janoff, E.N., Shugars, D., Worley, P., Tucker, C., *et al* (1997) "Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-I" *Oral Dis*; **3**(Suppl 1): S64-9.

Wang, J. H., Wang, K., Bartling, B. e Liu, C. (2009) "The Detection of Alkaline Phosphatase Using an Electrochemical Biosensor in a Single-Step Approach, *Sensors*, **9**, 8709-8721.

Wheeler, M.D., Katuna, M., Smutney, O.M., Froh, M., Dikalova, A., Mason, R.P., *et al.* (2001) "Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia reperfusion injury" *Human Gene Therapy*, **12**: 2167-2177.

Wroblewski, F., Ladue, J.S. (1956) "Serum Glutamic Pyruvic Transaminase in Cardiac and Hepatic Disease" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**: 569.

Yabe, Y., Kobayashi, N., Nishihashi, T., Takahashi, R., Nishikawa, M., Takakura, Y., *et al.* (2001) "Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives" *J Pharmacol Exp Ther* , **298**:894- 899.

Yadav, S.S., Howell, D.N., Steeber, D.A., Harland, R.C., Tedder, T.F., Clavien, P.A. (1999) "P-selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver" *HEPATOLOGY*; **29**: 1494-1502.

Yoshidome, H., Kato, A., Edwards, M.J., Lentsch, A.B. (1999) "Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kB" *Hepatology*; **30**: 203-8.

Zhang, W., Wang, M., Xie, H.Y., Zhou L., Meng X.Q., Shi J., e Zheng S. (2007) "Role of Reactive Oxygen Species in Mediating Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Its Therapeutic Applications in Liver Transplantation, *Transplantation Proceedings*, **39**, 1332-1337.

Zhou, L., Liu, J., Luo, F. (2006) "Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma", *World J Gastroenterol*, **12**, 1175-1181.

Zwacka, R.M., Zhang, Y., Zhou, W., Halldorson, J., Engelhardt, J.F. (1998) "Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/C mice activates AP-1 and nuclear factor kB independently of Ikb degradation" *HEPATOLOGY*; **28**:1022-1030.